

–

**Die Rolle von EphrinA5 bei der Aggregation und Migration
kortikaler Neurone während der Entwicklung des
Telencephalons**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller- Universität Jena

von

Dipl. Biol. Geraldine Zimmer
geboren am 14.11.1978 in Gera

-
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Bolz
 2. Gutachter: Prof. Dr. S. Löwel
 3. Gutachter: Professora Adjunta Dr. Daniela Uziel

Tag der Verteidigung: 22. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Entwicklung des Neokortex	1
1.2. Radiale und tangentielle Migration während der Entwicklung des Telencephalons	2
1.3. Molekulare Mechanismen der Zellmigration und der Zell-Zell-Adhäsion	5
1.3.1. Die Integrine	6
1.3.2. Die Cadherine und die Immunglobulin Superfamilie	7
1.4. Die Eph- Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihre Liganden	8
1.4.1. Die Eph-Rezeptor Familie	8
1.4.2. Die Liganden der Eph-Rezeptoren - die Ephrine	9
1.5. Eph/Ephrin-Interaktionen	10
1.5.1. Bindung und Clusterung von Ephrinen und deren Rezeptoren	10
1.5.2. Signaltransduktion der Eph-Rezeptoren und Ephrine	11
1.5.3. Die Src-Familie-Tyrosin-Kinasen	12
1.5.4. Das Eph/Ephrin-Paradoxon	13
1.5.5. Eph/Ephrin-Interaktionen während der Entwicklung	14
1.6. Zielstellung	16
3. Material und Methoden	18
3.1. Versuchstiere	18
3.2. Zelllinien	18
3.3. Wirtsbakterien	18
3.4. Vektor	18
3.5. Zellbiologische Methoden	19
3.5.1. Steriles Arbeiten	19
3.5.2. Primärkulturen: kortikale Einzelzellen auf verschiedenen Substraten	19
3.5.3. Co-Kulturen aus NIH/3T3 Fibroblasten und kortikalen Neuronen	21
3.5.4. Primärkulturen: Darstellung migrierender Neurone in coronalen Schnitten	22
3.6. Immunohistochemie	23
3.6.1. Immunohistochemische Markierungen an kortikalen Einzelzellen	23
3.6.1. Immunohistochemische Markierungen der EphrinA5-Fc Bindestelle an coronalen Schnitten	24
3.7. Proteinbiochemische Methoden	24
3.7.1. Immunpräzipitation von Gehirngewebe mit EphrinA5-Fc und Fc-Protein	24
3.7.2. SDS-PAGE und Darstellung im Western Blot	25
3.7.3. Abspaltung des IgG ₁ (Fc)-Teiles von EphrinA5-Fc	25
3.8. Molekularbiologische Methoden	27
3.8.1. Transfektion von Neuronen mittels Elektroporation	27
3.8.2. RT-PCR zum Nachweis der EphrinA5-Expression der NIH/3T3-Fibroblasten	28
3.8.3. <i>In situ</i> -Hybridisierung an dicken Schnitten	31
3.8.4. <i>In situ</i> -Hybridisierung an Kryostatschnitten	31
3.9. Mikroskopie	32
3.9.1. „time-lapse“ – Videomikroskopie kortikaler Neurone	33
3.9.2. „time-lapse“ – Videomikroskopie migrierender Zellen in coronalen Schnitten	33
3.10. Analyse	33

3.10.1. Statistik	33
3.10.2. Quantifizierung der Aggregation kortikaler Neurone	34
3.10.3. Quantifizierung der Fluoreszenzsignale der immunhistochemischen Markierungen auf dem EphrinA5-Fc Substrat	34
3.10.4. Quantifizierung der Intensitäten der PY99-Banden im Western Blot	34
3.10.5. Quantifizierung der Migration von MGE-Neurone auf coronalen Schnitten <i>in vitro</i>	34
4. Ergebnisse	36
4.1. Der Einfluß von EphrinA5 auf die Aggregation und Migration kortikaler Neurone <i>in vitro</i>	36
4.1.1. Geclustertes EphrinA5-Fc aktiviert EphA-Rezeptoren dissoziierter kortikaler Neurone <i>in vitro</i>	36
4.1.2. EphrinA5-Fc induziert die Aggregation kortikaler Neurone	37
4.1.3. Src-Famile-Kinasen sind involviert im <i>downstream-signalling</i> der EphA Rezeptor- vermittelten Zell-Aggregation	40
4.1.4. SFK-Inhibition bewirkt eine Konversion des repulsiven Effektes von EphrinA5 in Attraktion	43
4.1.5. EphA Rezeptoren werden nach der Bindung an das EphrinA5-Fc Substrat abgegeben	48
4.1.6. SFK-Aktivität ist an der Rezeptorabgabe der kortikalen Neurone an das EphrinA5-Fc Substrat beteiligt	50
4.1.7. Abgabe von EphA-Rezeptoren nach Zell-Zell Kontakt.....	52
4.2. Der Einfluß von EphrinA5 auf die tangentielle Migration GABAerger Interneurone <i>in vitro</i>	56
4.2.1. Methoden zur Darstellung und Quantifizierung migrierender Neurone <i>in vitro</i>	56
4.2.2. Vergleich der tangentialen Migration kortikaler Interneurone im <i>in vitro</i> -Modells mit der Migration <i>in vivo</i>	58
4.2.3. Untersuchung der Expressionsmuster von ausgewählten Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden <i>in vitro</i>	60
4.2.4. EphrinA5-Fc hat einen repulsiven Effekt auf die Neurone der ganglionischen Eminenzen <i>in vitro</i>	63
4.2.5. Der Einfluß von EphrinA5-Fc auf die tangentielle Migration <i>in vitro</i>	64
4.2.6. Das Vermeiden der Ventrikularzone nach EphrinA5 Zugabe <i>in vitro</i> ist abhängig vom Grad der Clusterung	69
4.2.7. Das EphA-vermittelte Vermeiden der VZ der LGE <i>in vitro</i> ist abhängig von der Aktivität der SFKs....	71
4.2.8. Die Rolle des Eph/Ephrin System bei der Vermeidung der striatalen Anlage	75
5. Diskussion	77
5.1. Die Rolle von Ephrinen und Eph-Rezeptoren bei Zell-Zell-Aggregation, Zell-ECM-Interaktionen und Migration	77
5.2. der <i>Slice</i>-Assay als Modellsystem zur Untersuchung der tangentialen Migration kortikaler Interneurone	79
5.3. Repulsive Effekte von EphrinA5	80
5.4. Ein molekularer Schalter für Attraktion und Repulsion.....	81
5.5. Die Abgabe von Eph-Rezeptoren ermöglicht migratorische Prozesse	82
5.6. Mögliche Funktionen von EphrinA-induzierter Aggregation und Repulsion während der Kortextentwicklung	83
5.7. Mögliche Funktionen des Eph/Ephrin Systems bei der tangentialen Migration der MGE-Neurone .	84
5.8. Ausblick	86
6. Zusammenfassung	87

7. Referenzen	89
8. Anhang	I
8.1. Puffer, Lösungen und Reagenzien	I
8.1.1. Primärkultur	I
8.1.2. Lösungen und Medien für die Zellkultur mit NIH/3T3-Fibroblasten	II
8.1.3. Sonstige Lösungen	III
8.1.4. Fixierung und Immunhistochemie	III
8.1.5. Immunpräzipitation	IV
8.1.6. enzymatische Abspaltung des IgG ₁ von rekombinantem EphrinA5-Fc	V
8.1.7. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	V
8.1.8. Materialien zur Amplifizierung des pEYFPmem-Vectors in E.coli und dessen Isolation	VI
8.1.9. Puffer für RNA- und DNA-Gelelektrophorese	VI
8.1.10. Puffer für <i>in situ</i> -Hybridisierung	VII
8.2. weitere Materialien	VIII
8.2.1. rekombinante Proteine	VIII
8.2.3. Antikörper	VIII
8.2.4. Enzyme	IX
8.2.5. Sonden	IX
8.2.6. Chemikalien	X
8.2.7. Geräte	XIII
8.2.8. Weitere Verbrauchsmaterialien	XIV
8.3. Zusatzmaterial: Time-Lapse Aufnahmen	XIV
8.4. Abkürzungen	XV
8.5. Ehrenwörtliche Erklärung	XVI
8.6. Danksagung	XVII
8.7. Lebenslauf	XIX
8.8. Eigene Publikationen	XX

Sein und Wissen ist ein uferloses Meer: Je weiter wir vordringen, umso unermesslicher dehnt sich aus, was noch vor uns liegt; jeder Triumph des Wissens schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich.

Isaac Newton

-meiner Urgroßmutter-

1. Einleitung

Die Entwicklung vielzelliger Organismen ist ein komplexer Prozess, bei dem eine Vielzahl ineinander greifender Vorgänge die Zelldifferenzierung, die Entstehung von Zellverbänden und Ausbildung von Strukturen mit entsprechender Funktionalität regulieren. Das Gehirn, als das komplexeste aller Systeme, besteht bei den Säugetieren aus 10^{12} Neuronen, die über 10^{15} Synapsen spezifisch miteinander verknüpft sind und wohl das leistungsfähigste Netzwerk bilden. Es ist erstaunlich, wie sich aus dem scheinbar geringen genetischen Informationsgehalt der Zellen, der noch dazu in jeder Zelle gleich ist, ein solch komplexes Organ entwickelt. Dazu müssen die Entwicklungsvorgänge wie Induktion, Proliferation, Bildung neuronaler Vorläuferzellen, Differenzierung, Wegfindung der Neuronen (Migration) und das Auswachsen von Axonen (axonale Lenkung) zu einem Bestimmungsort, als auch die Entstehung spezifischer neuronaler Kontakte gesteuert und reguliert werden. Bei der Kontrolle der Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge spielen räumlich und zeitlich begrenzt gebildete Regulatorproteine (Transkriptionsfaktoren) eine wesentliche Rolle, die ermöglichen, dass Gene zur richtigen Zeit und im rechten Ausmaß abgelesen werden, die dann wiederum die Proteine zum Aufbau und der Funktionalität des Nervensystems erzeugen. Aus multipotenten, mitotisch aktiven Vorläuferzellen in den proliferativen Zonen nahe der Ventrikel des sich entwickelnden Gehirns differenzieren sich neuronale und gliale Zellen mit festgelegter Identität, die aus den proliferativen Zonen bis in die jeweiligen Zielgebiete wandern, wo sie spezifische Kontakte mit anderen Zellen ausbilden und an der Ausbildung differenzierter Strukturen des Gehirns beteiligt sind.

1.1. Die Entwicklung des Neokortex

Die Neurone des Neokortex, die Pyramidenzellen und Interneurone sind horizontal in sechs Schichten und vertikal in Kolumnen oder Säulen angeordnet. Die Neurone der verschiedenen Säulen haben unterschiedliche funktionelle Eigenschaften, wohingegen die Neurone innerhalb einer Säule auf ähnliche Reizparameter, wie zum Beispiel Form oder Farbe im visuellen Kortex antworten (Hubel et al., 1962). Die laminare Organisation des Kortex ist bereits morphologisch durch die unterschiedliche Größe und Packungsdichte der Zellen erkennbar. Die Zellen der bestimmten Schichten weisen zusätzlich zur Morphologie auch unterschiedliche neurochemische und physiologische Eigenschaften auf. Die Zellen der bestimmten Schichten unterscheiden sich bezüglich ihrer Transmitterexpression, der intrinsischen, efferenten und afferenten Kontakte. So verzweigen die Axone von Pyramidenzellen der Schicht 6 in Schicht 4 jedoch nicht in Schicht 5. Neurone der Schicht 2/3 bilden wiederum Axonkollaterale in Schicht 2/3 und 5 aus, hingegen nicht in Schicht 4 und 6. In Schicht 4 terminieren die thalamischen afferenten Fasern (Garey et al., 1971; Lund et al., 1977). Die Efferenzen der Schichten 5 und 6 bilden subkortikale, die Zellen der oberen Schichten kortiko-kortikale Verbindungen aus (Gilbert et al., 1975). Die hochpräzisen und stereotypen inter- und intrakortikalen Verbindungen der Zellen der verschiedenen Schichten sind entscheidend für die Ausbildung kortikaler Schaltkreise

(Gilbert et al., 1979; Bolz et al., 1989; Katz et al., 1992). Die neuronale Identität und somit die Schichtenspezifität der Neurone korreliert mit dem Zeitpunkt der Geburt. Die Ausbildung der kortikalen Schichten geschieht nach dem *inside-out*-Prinzip, wobei tiefere Schichten zuerst, superfizielle Schichten später gebildet werden (McConnell, 1988). Postmitotische Neurone die sich früh aus Vorläuferzellen der Ventrikularzone differenzieren (E10 bis E14 bei der Maus), wandern radial aus und bilden die tieferen Schichten 6 und 5, spätere postmitotische Zellen bilden die oberen supragranulären kortikalen Schichten (Rakic, 1971, 1974; McConnell, 1988; Misson et al., 1991; Nadarajah et al., 2001). Dies gilt nur für die exzitatorischen glutamergen Pyramidenzellen des Kortex. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die kortikalen GABAergen Interneurone in den proliferativen Zonen des basalen Telencephalon gebildet werden und tangential auf verschiedenen Migrationswegen in den sich entwickelnden Kortex einwandern (Marin et al., 2001a; Gorski et al., 2002).

1.2. Radiale und tangentielle Migration während der Entwicklung des Telencephalons

Radial auswandernde kortikale Neurone aus der Proliferationszone zum Zielort des sich entwickelnden Kortex weisen zwei verschiedene Migrationsmodi auf, die Zellkern-Translokation und Zell-Lokomotion (Rakic, 1971, 1974; Book et al., 1990; Misson et al., 1991; Nadarajah et al., 2001). Bei der Zellkern-Translokation wird zuerst ein *leading*-Fortsatz in Migrationsrichtung zum Zielgebiet ausgesendet und der Zellkern wird anschließend nachgezogen, wobei sich der *leading*-Fortsatz verkürzt. Diese Form der Migration scheint unabhängig von Gliazellen zu sein und kommt vor allem bei auswandernden Neuronen während früher Stadien der Kortexentwicklung vor, die zur Ausbildung der Präplatte beitragen (Miyata et al., 2001; Nadarajah et al., 2001). Die Zell-Lokomotion beschreibt eine Form von Migration, bei der der gesamte Zellkörper mit *leading* und *trailing* Fortsatz entlang von radialen Gliazellen bewegt wird, die den Neuronen als Gerüst dienen. Diese Form von radialer Migration dominiert bei Zellen die zu späteren Stadien die kortikale Platte bilden (Nadarajah et al., 2002).

Neben der radialen Migration der Projektionsneurone zeigen GABAerge Interneurone des Subpalliums eine weitere Migrationsform, die tangentielle Wanderung in den Kortex, den Hippocampus und den olfaktorischen Bulbus (de Carlos et al., 1996; Anderson et al., 1997; Tamamaki et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 1999; Wichterle et al., 2001). Die Area Entopeduncularis (AEP), die mediale ganglionische Eminenz (MGE) und die laterale ganglionische Eminenz (LGE) sind die Strukturen des subpallialen Telencephalons, in denen meisten GABAergen kortikalen Interneurone entstehen, die auf distinkten Routen tangential in den Kortex und die anderen Regionen migrieren (Van Eden et al., 1989; DeDiego et al., 1994; Anderson et al., 1997; Mione et al., 1997; Tan et al., 1998; Lavdas et al., 1999; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marin et

al., 2001a; Olivier et al., 2001). Wie in Abbildung 1.2. dargestellt, scheinen während früher Stadien der Entwicklung des Telencephalons (E11,5 bis E12,5 in der Maus) die MGE und AEP die primären Herkunftsorte von kortikalen und striatalen Neurone zu sein (Anderson et al., 2001; Marin et al., 2001a). Während der Embryonalstage E12,5-14,5 entstehen die kortikalen Interneurone hauptsächlich in der MGE, die entweder dorsal oder ventral des sich entwickelnden Striatums (striatale Anlage) in die SVZ, in die tiefere intermediäre Zone und in die Subplatte des Kortex einwandern (Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marin et al., 2001a). Die LGE scheint zu diesem Zeitpunkt nicht zur Ausbildung kortikaler Interneurone beizutragen, allerdings zu Zellpopulationen, die in den olfaktorischen Bulbus einwandern (Anderson et al., 2001; Wichterle et al., 2001). Während späterer Stadien der Entwicklung (E14,5-16,5) entstammen die kortikalen Interneurone sowohl der LGE als auch der MGE (Anderson et al., 2001). Weiterhin konnten Studien von Nery et al. (2002) zeigen, dass die caudale ganglionische (CGE) Eminenz eine zusätzliche Quelle für tangential migrierende Interneurone des Kortex und des Hippocampus darstellt. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die verschiedenen Subtypen von GABAergen Interneuronen in verschiedenen Bildungsorten des subpallialen Telencephalons entstehen. So werden die Somatostatin- und Parvalbumin-exprimierenden Interneurone hauptsächlich in der MGE, die Calretinin-positiven Interneurone in der CGE gebildet (Wichterle et al., 2001; Valcanis et al., 2003; Xu et al., 2004).

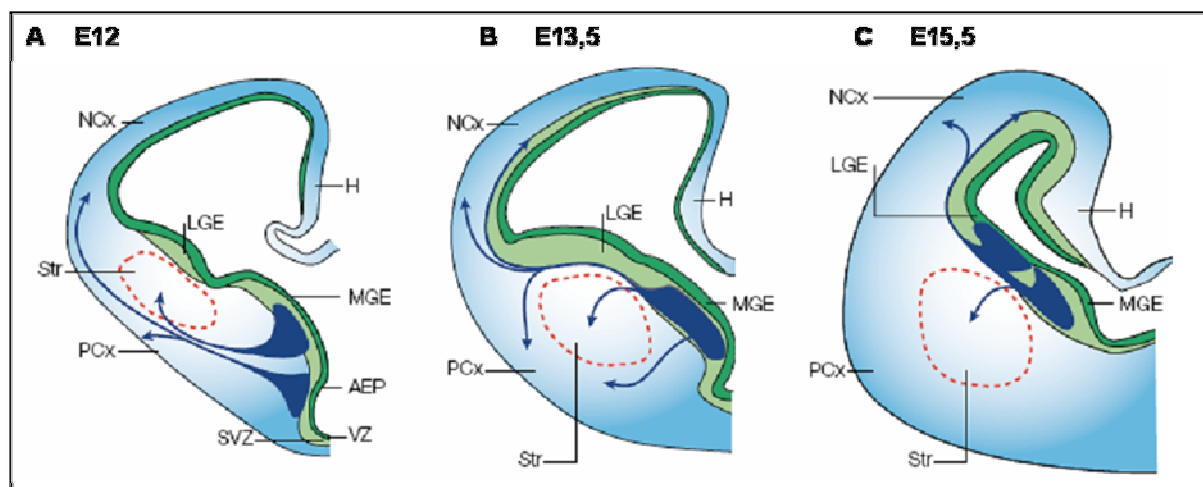


Abb. 1.2.: Die verschiedenen Migrationswege tangential auswandernder Interneurone von dem Subpallium in den Kortex (nach Marin und Rubenstein 2001). Wie in den Schemata der coronalen Schnitte von Telencephalon-Hemisphären dargestellt, werden mindestens drei räumlich und zeitlich verschiedene Wege der Migration unterschieden. **A**, frühe migratorische Interneurone werden in der MGE und der AEP gebildet und wandern superfiziell in den Kortex ein. **B**, Am Embryonaltag E13,5 migrieren die Interneurone der MGE in das sich entwickelnde Striatum und dorsal der striatalen Anlage in den Kortex ein. **C**, In späteren Stadien migrieren die Interneurone sowohl aus der MGE als auch der LGE dorsal des Striatums in den Kortex. NCx = Neokortex, PCx = piriformer Kortex, VZ = Ventrikulärzone, Str = striatale Anlage, MGE = mediale ganglionische Eminenz, LGE = laterale ganglionische Eminenz, AEP = Area Entopeduncularis, H = Hippocampus.

Diese räumlich und zeitlich verschiedenen migratorischen Ströme müssen gelenkt und reguliert werden, was die Koordination durch verschiedene Signale erforderlich macht. Es ist bereits bekannt, dass motogene Faktoren in der MGE, repulsive Faktoren im ventralen Telencephalon und der LGE, sowie attraktive und permissive Signale im Kortex an der Regulation der Migration der GABAergen Interneurone in den Kortex beteiligt sind (Marin et al., 2003a). HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor) wurden als motogene Faktoren für die Migration kortikaler Interneurone beschrieben (Powell et al., 2001; Polleux et al., 2002). Weiterhin konnten einige Moleküle identifiziert werden, die an der Abgrenzung definierter Routen für tangential migrierende Neurone beteiligt sind, wie das Slit/Robo und Semaphorin/Neuropilin System (Giger et al., 1996; Livesey et al., 1997; Skaliara et al., 1998; de Castro et al., 1999; Yuan et al., 1999). Slit 1 ist in der proliferativen Zone der ganglionischen Eminenzen exprimiert (Marillat et al., 2002) und zeigt eine repulsive Wirkung auf subpalliale Interneurone *in vitro*, woraus abgeleitet wurde, dass dieses Molekül an der Repulsion der Interneurone aus den proliferativen Zonen beteiligt ist (Hu, 1999; Wu et al., 1999; Zhu et al., 1999; Chen et al., 2001). Arbeiten von Marin et al. (2001) haben gezeigt, dass kortikale Interneurone Neuropilin 1 und 2 exprimieren und somit die striatale Anlage vermeiden, in der Sema3A und Sema3F exprimiert werden. Interneurone, die keine Neuropilin-Rezeptoren exprimieren wandern in das sich entwickelnde Striatum ein (Abb. 1.2.1.)

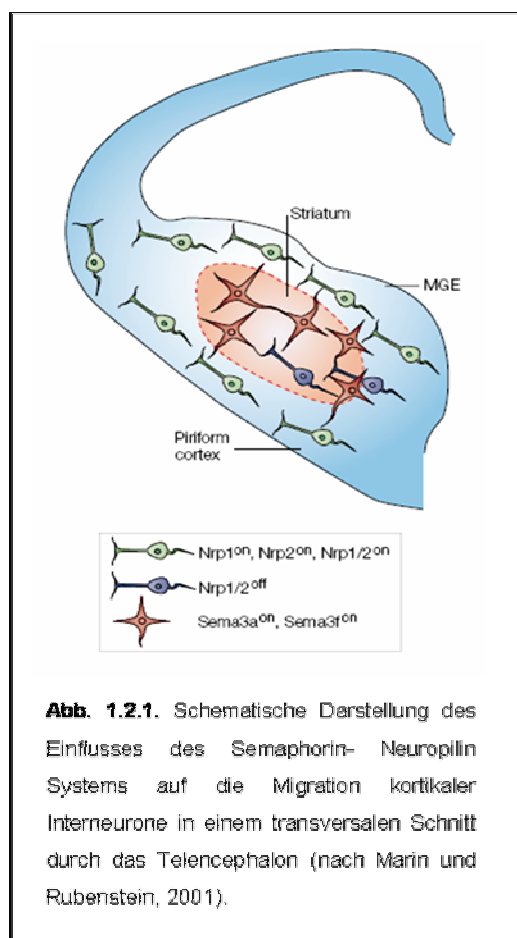


Abb. 1.2.1. Schematische Darstellung des Einflusses des Semaphorin-Neuropilin Systems auf die Migration kortikaler Interneurone in einem transversalen Schnitt durch das Telencephalon (nach Marin und Rubenstein, 2001).

Neben repulsiven Mechanismen konnten auch Moleküle identifiziert werden, die durch attraktive Interaktionen an der Lenkung und Wegfindung der migrierenden Interneurone beteiligt sind. Die Neureguline stellen eine Familie von Signalmolekülen dar, von denen vier Vertreter an die ErbB-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen-Familie binden können (Buonanno et al., 2001; Falls, 2003). Flames et al., (2004) konnte zeigen, dass Neuregulin1 *in vitro* eine attraktive Wirkung auf MGE-Neurone hat und in den proliferativen Zonen des Kortex exprimiert wird. Daraus wurde eine attraktive Wirkung von sezerniertem Neuregulin1 auf den Migrationsstrom kortikaler Interneurone abgeleitet. Ferner wurde gezeigt, dass die Interaktionen des ErbB4-Rezeptors der kortikalen Interneurone (Yau et al., 2003) mit dem membrangebundenen Neuregulin1-CRD der ganglionischen Eminenz an der korrekten Wegfindung der Zellen beteiligt sind (Flames et al., 2004). Weiterhin konnte herausgestellt werden, dass das LIM Homöodomänen Gen *Lhx6* von migrierenden kortikalen Interneuronen des MGE exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Wegfindung in den Kortex spielt (Lavdas et al., 1999).

1.3. Molekulare Mechanismen der Zellmigration und der Zell-Zell-Adhäsion

Zelladhäsionsvorgänge spielen eine zentrale Rolle während der Proliferation, Differenzierung, Migration und Zellaggregation, die zur Ausbildung von funktionsfähigen Geweben und Organen führen. Zelladhäsion bezeichnet den über Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Kontakt zu Nachbarzellen (Zell-Zell-Kontakt) oder zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion). Zell-Zell-Adhäsionen sind entscheidend für den Zusammenschluss und die Segregation von Zellen zu einem Zellverband, Zell-Matrix-Interaktionen überwiegen bei Migrationsprozessen. Die Ausbildung von adhäsiven Kontakten zwischen Zellen oder Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) resultiert aus einer Kooperation von den membranständigen Adhäsionsmolekülen und dem Aktin-Zytoskelett, und der regionalen Generation von kontraktile Kräften über die Zelle.

Während der Embryonalentwicklung stellt die Migration von Zellen einen wichtigen Vorgang für die Ausbildung von Strukturen und Geweben dar, angefangen von der Gastrulation bis hin zur Entwicklung des Nervensystems. Auch im adulten Organismus in der normalen Physiologie und während pathologischen Prozessen spielt die Zellmigration eine bedeutende Rolle. Das Verständnis der Zellmigration als ganzheitlichen Prozess erfordert die Betrachtung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der vielfältigen Komponenten und Strukturen. Eine wichtige Eigenschaft aller migrierenden Zellen ist die Fähigkeit zur Polarisierung in Vorder- und Rückseite entsprechend der Bewegungsrichtung (Lauffenburger et al., 1996), mit lokaler Ausbildung von F-Aktin (Coates et al., 1992), mit der asymmetrischen Verteilung chemosensorischer Rezeptoren (Sullivan et al., 1984), ECM-Rezeptoren oder Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Lawson et al., 1995), sowie der lokalen Ausbildung von Integrin-Zytoskelet-Verbindungen (Schmidt et al., 1993). Während der Migration erfolgt eine Membranerweiterung in Bewegungsrichtung (Lamellipodia, Filopodia), die Ausbildung und Stabilisierung von Zell-ECM oder Zell-Zell-Verbindungen, die Entstehung kontraktile Kräfte und schließlich die Loslösung von Zell-ECM- oder Zell-Zell-Verbindungen an der Rückseite der Zellen, um eine Vorwärtsbewegung zu ermöglichen (Lauffenburger et al., 1996). Verschiedene Zelloberflächen-Rezeptoren sind an der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-ECM-Verbindungen beteiligt. Die wichtigste Gruppe, die Zell-ECM-Interaktionen, aber auch Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, sind die Integrine. Cadherine, Selektine und die Immunglobulin Superfamilie sind wichtige Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen, die in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten involviert sind.

1.3.1. Die Integrine

Die Integrine stellen eine große Gruppe von heterodimeren transmembranalen Glykoproteinen dar. Bisher wurden mindestens 15 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten identifiziert, die kombinatorisch miteinander assoziiert werden und so eine vielfältige Familie von Rezeptoren mit jeweils einer α - und einer β -Untereinheit und entsprechender Liganden-Spezifitäten generieren (Hynes et al., 1992). Die $\beta 1$ -Integrine sind auf allen Zelltypen vorhanden und binden hauptsächlich an Komponenten der ECM wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Vitronectin. Integrine können nach Aktivierung intrazellulär entweder direkt über Adaptorproteine wie Talin und Vinculin (Calderwood et al., 2002; Garcia-Alvarez et al., 2003) oder indirekt über die Aktivierung der *Focal Adhesion Kinase* (FAK) (Turner, 2000; Parsons, 2003) mit dem Zytoskelett gekoppelt werden. Somit stellen die Integrine die Verbindung des Aktin-Zytoskeletts mit der Umgebung her, wodurch migratorische Prozesse erst ermöglicht werden. Die Signalkaskade nach Integrinaktivierung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass zahlreiche Phosphorylierungsprozesse von assoziierten Proteinen nach Integrin-Aktivierung stattfinden. Das Integrin-vermittelte *signaling* kann zum Beispiel zur Aktivierung der FAK durch Autophosphorylierung führen (Schaller et al., 1993). Weiterhin kann die Integrin-Aktivierung nach Bindung an Fibronectin in einer transienten Aktivierung von Src, einem Mitglied der Src-Familie-Kinasen (SFKs) resultieren (Kaplan et al., 1995). Dadurch werden die SH2 und SH3 Domänen von Src demaskiert, die somit an phosphorylierte Tyrosinreste binden und den Start von weiteren Phosphorylierungskaskaden darstellen können. Zum Beispiel ist die SH3 Domäne von Src für dessen Assoziation mit dem *focal adhesion complex* wichtig (Kaplan et al., 1994).

Viele Integrine sind nicht ständig aktiv, die Aktivität der Integrine kann und muss von den Zellen reguliert werden. Die intrinsische Regulation der Integrinaktivität wird als *inside-out-signaling* bezeichnet, wohingegen die Aktivierung der Integrine durch deren Liganden und die nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktionskaskade entsprechend *outside-in-signaling* genannt wird. Die Notwendigkeit der Regulation von Integrinen wird besonders während migratorischer Vorgänge deutlich, wobei adhäsive Komplexe räumlich und zeitlich abgestimmt gebildet und losgelöst werden müssen (Lauffenburger et al., 1996). Die Modulierung der Affinitäten von Integrinen durch deren Konformationsänderung wird als ein Hauptmechanismus der Regulation betrachtet, wobei die genauen Abläufe noch nicht vollständig aufgeklärt worden sind. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Bindung von weiteren Proteinen an die zytoplasmatischen Domänen der $\alpha 1 \beta 3$ -Integrine und Leukozyten $\beta 2$ -Integrine die Affinitäten und/oder die adhäsiven Zustände der extrazellulären Regionen kontrollieren (Sasry et al., 1993; Cheng et al., 1994). Weitere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass Integrine durch Eph/Ephrin-Interaktionen sowohl negativ als auch positiv reguliert werden können. Dabei kann das EphB/EphrinB-System die Integrinaktivität fördern bzw. verstärken (Huynh-Do et al., 2002), eine EphA2-Aktivierung führt hingegen zur Konformationsänderung von Integrinen in einen inaktiven Zustand (Miao et al., 2000).

Für migrierende Fibroblasten wurde während der Integrin-vermittelten Migration ein weiterer Mechanismus zur Regulierung der adhäsiven Integrin-ECM-Komplexe beschrieben, das *membrane*

ribbing (Regen et al., 1992). Die von den Fibroblasten gebildeten adhäsiven Integrin-Substrat-Verbindungen werden an der Hinterseite der Zellen *in vivo* und *in vitro* an das Substrat abgegeben (Bard et al., 1975; Chen, 1981), also von der Region, die weniger stabile Integrin-Zytoskelett-Verbindungen ausbildet. An der Vorderseite werden hingegen die Integrin-Zytoskelett-Verbindungen stabilisiert (Schmidt et al., 1993). Diese Daten werden dadurch unterstützt, dass Moleküle wie Talin oder Vinculin, die die Integrine mit dem Zytoskelett verbinden, nicht in den Integrin-Rückständen auf dem Substrat identifiziert werden konnten (Lauffenburger et al., 1996). Vermutlich fördern die verminderten Zytoskelett-Integrin-Verbindungen die Abgabe von Membranfragmenten mit den enthaltenen Integrinen, ermöglichen so das Loslösen adhäsiver Komplexe und bestimmen damit die generelle Migrationsrate (Chen, 1981; Schmidt et al., 1993; Schmidt et al., 1995).

1.3.2. Die Cadherine und die Immunglobulin Superfamilie

Bei der Ausbildung von Zellverbänden spielen heterophile und homophile Zell-Zell-Interaktionen, die zum Zusammenschluss gleichartiger Zellen (Adhäsion) und zur Abstoßung verschiedenartiger Zellen führen, eine entscheidende Rolle. Zwei große Gruppen von Proteinen, die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, sind die Cadherine und die Gruppe der Immunglobulin Superfamilie (IgSF). Cadherine sind eine Familie von transmembranalen kalziumabhängigen Proteinen, die durch Ausbildung von homophilen Bindungen eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung und dem Zusammenschluss gleichartiger Zellen spielen (Takeichi, 1991). Cadherine sind intrazellulär mit dem Aktin-Zytoskelett über α -Catenin, β -Catenin, Plakoglobin und p120^{CAS} assoziiert (Gumbiner, 1996). Cadherine sind auch in der Lage, über β -Catenin Signale in das Zellinnere weiterzuleiten (Orsulic et al., 1996).

Die Immunglobulin-Superfamilie ist mit 100 bekannten Mitgliedern die größte Familie strukturverwandter Proteine (Brummendorf et al., 1995). Das gemeinsame Strukturelement ist das Vorhandensein von mindestens einer Immunglobulinartigen (Ig) Domäne. Die Immunglobuline können die unterschiedlichsten Funktionen haben. Eine Untergruppe stellen die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF dar, die kalziumunabhängige Zell-Zell-Adhäsionen vermitteln. Eine große Unterfamilie umfasst die Zelladhäsionsmoleküle des Nervensystems, zu denen das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, L1, NgCAM (**N**euron-**G**lia-**C**ell **A**dhesion **M**olecule), NrCAM und andere Vertreter gehören (Rougon et al., 2003).

1.4. Die Eph- Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihre Liganden

Die membranständigen Ephrine und Eph-Rezeptoren werden weitläufig im Nervensystem exprimiert und vermitteln als Signal- und Lenkungsmoleküle durch attraktive und/oder repulsive Wirkungen die korrekte Verschaltung von Neuronen in verschiedenen Bereichen im sich entwickelnden Nervensystem. So sind die Interaktionen zwischen Eph-Rezeptoren und deren Liganden in die axonale Lenkung (Drescher et al., 1997; Flanagan et al., 1998; Wilkinson, 2000; Knoll et al., 2002), Zell-Zell-Adhesion (Holmberg et al., 2000) und Zellmigration (Santiago et al., 2002) involviert.

1.4.1. Die Eph-Rezeptor Familie

Die Tyrosin-Kinase Rezeptoren zeichnen sich durch ihren intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität der intrazellulären Kinase Domäne aus. Sie unterteilen sich in mehrere Unterfamilien, wobei die Eph-Rezeptoren mit bisher 14 identifizierten Mitgliedern die größte Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen darstellen (Tuzi et al., 1994; van der Geer et al., 1994; Muller et al., 1996; Pasquale, 1997; Zisch et al., 1997a). Der Name **Eph**-Rezeptoren entstammt dem ersten beschriebenen Vertreter, der aus einer Erythropoetin-produzierenden humanen hepatozellulären Karzinoma-Zelllinie isoliert wurde (Hirai et al., 1987). Die extrazelluläre Domäne der Eph-Rezeptoren besteht aus einer hoch konservierten N-terminalen globulären Domäne, bestehend aus 180 Aminosäuren, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Labrador et al., 1997). Dem schließt sich eine Cystein-reiche Region und zwei Fibronectin-Typ III Domänen an, die bei der Rezeptor-Dimerisierung (Lackmann et al., 1998) und/oder bei Interaktionen mit anderen Proteinen, wie NMDA-Rezeptoren (Dalva et al., 2000), involviert sein können. Auf die transmembranale Domäne folgt ein hoch konserviertes juxtamembranales Motiv mit zwei Tyrosin-Resten, die die Autophosphorylierung vermitteln. Das carboxyterminale Ende enthält einen weiteren konservierten Tyrosin-Rest. Die Eph-Rezeptoren werden entsprechend ihrer Sequenzhomologie und ihrer Ligandenbindungs-Affinitäten in zwei Klassen, die EphA-Rezeptoren und EphB-Rezeptoren unterteilt (Abb. 1.4.). Die Eph-Rezeptoren werden überwiegend im Nervensystem hauptsächlich während der Entwicklung, aber auch adult Regionen- und Zeit-spezifisch exprimiert (Mackarechtschian et al., 1999; Liebl et al., 2003; Yun et al., 2003; Kudo et al., 2005; Niehage et al., 2005).

1.4.2. Die Liganden der Eph-Rezeptoren - die Ephrine

Die membrangebundenen **Eph-Rezeptoren** interagierenden **Proteine**, oder kurz Ephrine werden wie deren Rezeptoren strukturell und basierend auf Sequenzhomologien in 2 Gruppen, die A-Ephrine und die B-Ephrine unterteilt. Die A-Ephrine sind über GPI (Glykosylphosphatidylinositol) mit der Zellmembran verankert, die B-Ephrine stellen eine Gruppe transmembranaler Proteine dar. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Ephrine zwar an mehrere Eph-Rezeptoren, jedoch nur innerhalb der entsprechenden Rezeptorgruppe, binden (Gale et al., 1996b). Die Liganden binden allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten an die verschiedenen Rezeptoren einer Gruppe (Flanagan et al., 1998). So ist zum Beispiel die Dissoziationskonstante nach Bindung von EphrinA5 an den EphA3-Rezeptor deutlich niedriger als nach Bindung an EphA4 oder EphA5 (Gale et al., 1996a; Monschau et al., 1997). Es war bekannt, dass EphA1 eine Ausnahme bildet, EphA1 kann nur durch die Bindung von EphrinA1 aktiviert werden. Außerdem wurde beobachtet, dass der EphA4-Rezeptor auch mit B-Liganden interagieren kann (Flanagan et al., 1998). In neueren Untersuchungen wurde darüber hinaus gezeigt, dass EphrinA5 auch mit EphB2 interagieren kann und die Clusterung und Aktivierung des Rezeptors auslöst, was zu einer Neuriten-Retraktion führt. Die gleiche Antwort wird auch durch die Bindung von EphrinB-Liganden vermittelt (Himanen et al., 2004). Somit sind die Interaktionen der Eph/Ephrin Familie noch komplexer als bisher angenommen. Ein Überblick über die bisher bekannten Interaktionsmöglichkeiten ist in Abb. 1.4. dargestellt.

Die Aktivierung der Rezeptoren und die nachfolgende Signalweiterleitung der Rezeptor-exprimierenden Zelle wird als *forward signaling* bezeichnet. Die Ephrin-Familie ist ferner dafür bekannt, dass auch durch die Bindung der Rezeptoren an die Liganden eine Signaltransduktionskaskade in den Liganden-exprimierenden Zellen ausgelöst werden kann. Im Gegensatz zum *forward signaling* wird dieser Vorgang als *reverse signaling* bezeichnet. *Reverse signaling* wurde zuerst für die transmembranalen B-Ephrine beschrieben (Henkemeyer et al., 1996; Holland et al., 1996; Bruckner et al., 1997). Neuere Arbeiten geben darüber hinaus Hinweise darauf, dass es auch für die A-Ephrine eine Signalweiterleitung nach Rezeptorbindung gibt, die vermutlich über Adaptorproteine der *lipid rafts* vermittelt wird. Es ist bekannt, dass die Membran Mikrodomänen aufweist, die sich durch die Anreicherung von Glycosphingolipiden und Cholesterol, sowie durch ihre einzigartige Proteinzusammensetzung auszeichnen (Anderson, 1998; Simon, 2000). Zu diesen Proteinen gehören unter anderem GPI-verankerte Proteine auf der extrazellulären Seite (Brown et al., 1992; Anderson, 1998). G-Proteine und Mitglieder der Src-Familie-Kinasen (SFKs) können mit der inneren Seite der Membran assoziiert sein (Sargiacomo et al., 1993; Robbins et al., 1995). Aufgrund der Co-Lokalisation von Oberflächenmolekülen mit Proteinen, die potentiell Signale in das Zellinnere weiterleiten können, wird vermutet, dass diese *lipid rafts* Plattformen für die Integration verschiedener Signale darstellen, über die auch *reverses signalling* der A-Ephrine stattfinden könnte (Davy et al., 1999; Davy et al., 2000).

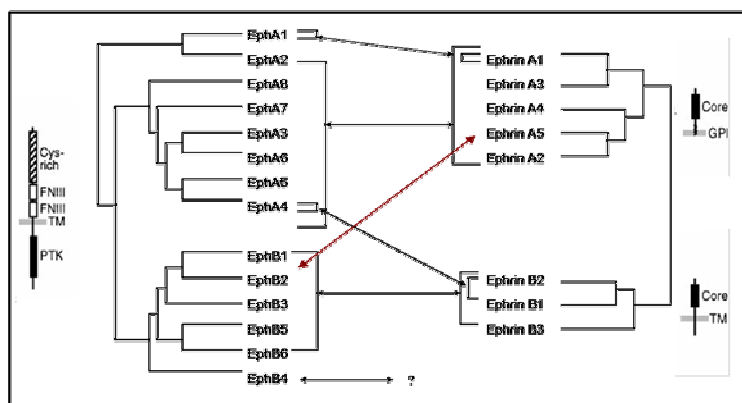


Abb. 1.4.: Sequenzhomologien und Interaktionen von Ephrinen und deren Rezeptoren nach Davis et al., 1994; Gale et al., 1997; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998; Himanen et al., 2004.

1.5. Eph/Ephrin-Interaktionen

1.5.1. Bindung und Clusterung von Ephrinen und deren Rezeptoren

Die Aktivierung der Eph-Rezeptoren durch die Liganden erfordert deren Membranbindung und Zusammenfassung zu Oligomeren (Davis et al., 1994). Monomere Liganden können die Eph-Rezeptoren nicht aktivieren (Davis et al., 1994). Allerdings ist eine Aktivierung von Eph-Rezeptoren bereits durch dimere Liganden möglich (Caras, 1997; Stein et al., 1998b; Weinl et al., 2003), wobei die Art der Antwort auch von dem dimeren oder multimeren Status der Liganden abhängen kann, wie es für EphrinB1 *in vitro* gezeigt werden konnte (Stein et al., 1998a). Die Oligomerisierung der Liganden kann durch die Membranverankerung und auch über homophile Interaktionen der extrazellulären Domäne der Liganden erfolgen (Davis et al., 1994; Himanen et al., 2003). Aufgrund der Stöchiometrie der Bindung von Eph-Rezeptoren und Liganden von 1:1 erfordert der minimale aktive Rezeptor-Ligandenkomplex zwei Rezeptoren und zwei Liganden (Lackmann et al., 1997). Die extrazellulären Domänen der Liganden binden zwei Rezeptoren über eine hoch-affine Heterodimerisations-Bindestelle (Himanen et al., 2001; Toth et al., 2001; Himanen et al., 2003). Schließlich können die Heterodimere über niedrig-affine Bindungen Heterotetramere ausbilden, wobei jeder Ligand mit zwei Rezeptoren und jeder Rezeptor mit zwei Liganden interagiert (Himanen et al., 2001).

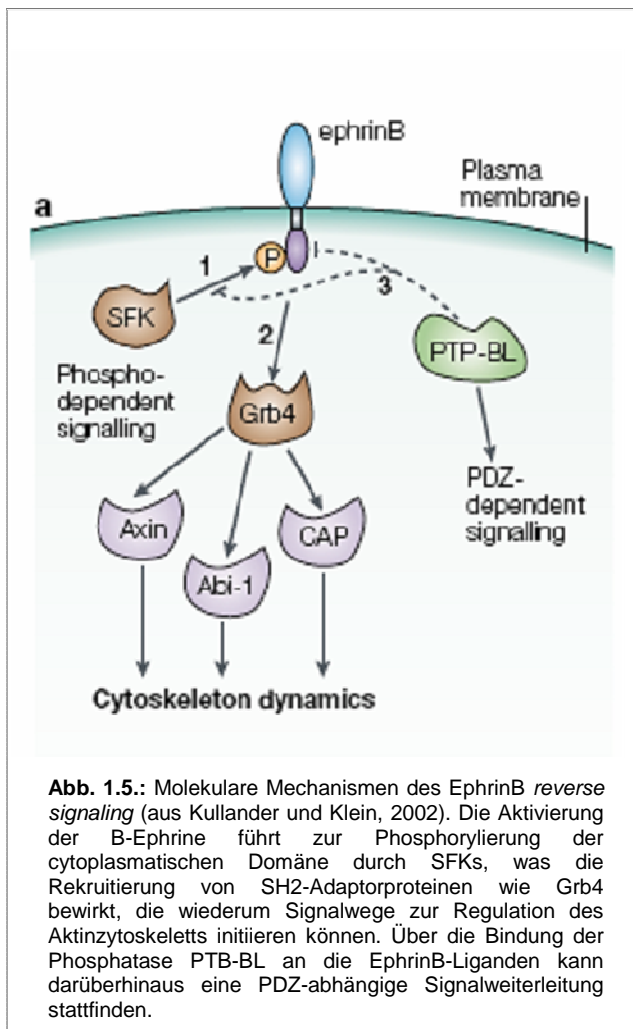
Verschiedene Protein-Protein-Interaktions-Domänen der Rezeptoren und Liganden könnten an der Oligomerisierung von Eph/Ephrin-Tetrameren beteiligt sein, wie zum Beispiel die cytoplasmatische SAM-Domäne (Thanos et al., 1999) und die EGF-ähnliche Domäne (Lackmann et al., 1998) der Eph-Rezeptoren. Zusätzlich können Eph-Rezeptoren Liganden-unabhängig in bereits bestehende Eph/Ephrin-Cluster über die extrazelluläre Domäne rekrutiert werden (Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Auf der Seite der B-Liganden trägt der juxtamembranale Teil der cytoplasmatischen Region (Song et al., 2002) als auch die Interaktionen mit PDZ-Domänen Proteinen in *lipid rafts* (Torres et al., 1998; Bruckner et al., 1999) zur Oligomerisation bei. Die Clusterung der A-Ephrine kann durch deren

GPI-Anker in *lipid rafts* gefördert werden (Gauthier et al., 2003). Zusätzlich können auch die homophilen Interaktionen der extrazellulären Domänen der Ephrin-Liganden zur Oligomerisierung der Signal-Cluster nach bestehender Rezeptor-Liganden-Bindung beitragen (Himanen et al., 2003). Die Clusterung der Rezeptoren durch die Liganden resultiert in einer Autophosphorylierung der Rezeptoren an den intrazellulären Tyrosinresten, wodurch weitere Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine geschaffen werden, die an der Signaltransduktionskaskade beteiligt sind (Pawson et al., 1990; van der Geer et al., 1994).

1.5.2. Signaltransduktion der Eph-Rezeptoren und Ephrine

Die Aktivierung aller Rezeptor-Tyrosin-Kinasen erfolgt nach einem generellen Mechanismus. Die Ligandenbindung führt zur Rezeptordimerisierung und begünstigt somit die *trans*-Phosphorylierung der intrinsisch unterdrückten Kinasedomänen der Rezeptormonomere, was dann zur Aktivierung dieser katalytischen Domänen führt (Hubbard et al., 2000; Pawson et al., 2000; Schlessinger, 2000; Simon, 2000). Die aktive Kinase kann somit durch die Phosphorylierung anderer Moleküle, einschließlich der Kinasedomänen benachbarter Rezeptoren, die *downstream*-Signalkaskade einleiten. Viele der bisher identifizierten nachgeschalteten *downstream* Moleküle enthalten Src-homologe 2 (SH2)-Domänen, die an die Phosphotyrosin-Motive aktivierter Eph-Rezeptoren binden, wie zum Beispiel P85 (Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase; (Pandey et al., 1994)) und SLAP (Src-like Apaptor-Protein; Pandey et al., 1995). Der Tyrosinrest 614 des EphB3-Rezeptors bildet die Bindestelle für einige SH2-Domänen-Proteine wie Fyn, Crk und rasGAP (Hock et al., 1998). Fyn stellt ein Mitglied der SFKs dar, die über zwei hochkonservierte phosphorylierte Tyrosinreste an die juxtamembranale Region der Eph-Rezeptoren binden (Ellis et al., 1996; Zisch et al., 1998). Durch die Bindung der SFKs an die Eph-Rezeptoren können diese wiederum die Funktion und/oder die Bindungsaffinität anderer Signalmoleküle modulieren, zum Beispiel Bestandteile des Integrin-Adhäsions-Komplex, Neural-Wiskott Aldrich Syndrom Protein (N-WASP) oder Cortactin (Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes) (Abram et al., 2000). Des Weiteren können eine Vielzahl von Proteinen Phosphorylierungs-unabhängig an Eph-Rezeptoren binden. Dazu gehören *guanine-exchange-factors*, die Rho-Familie GTPasen regulieren, und PDZ-Domänen Proteine (Hock et al., 1998; Torres et al., 1998). PDZ Domänen stellen modulare Protein-Interaktions-Domänen dar, die an das PDZ-Motiv, bestehend aus kurzen Peptidsequenzen von ungefähr 4 Aminosäuren am C-Terminus der Liganden binden. Typischerweise enthalten PDZ-Domänen Proteine mehrere PDZ-Domänen, wodurch diese Proteine als Adaptoren mehrere Proteine vernetzen können, so zum Beispiel Membranproteine mit Cytoskelett-Proteinen (Craven et al., 1998). Diese vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten mit nachgeschalteten Signalmolekülen erschweren die Interpretation der Eph/Ephrin-regulierten Entwicklungsvorgänge und verdeutlichen die Notwendigkeit der Aufklärung dieser Signalwege.

Das *reverse signaling* der B-Ephrine nach Aktivierung durch deren Rezeptoren führt zur Phosphorylierung eines konservierten Tyrosin-Restes am C-Terminus der B-Liganden (Holland et al., 1996; Bruckner et al., 1997). Es ist bekannt, dass SFKs dabei als positive Regulatoren der Tyrosin-Phosphorylierung der EphrinB-Liganden wirken. Die Tyrosin-Phosphorylierung der EphrinB-Liganden führt zur Rekrutierung von Src-homologen (SH) Adaptorproteinen wie Grb4, die wiederum Signaltransduktionswege initiieren, welche die Dynamik des Zytoskeletts regulieren. Darüberhinaus kann die Phosphatase PTB-BL über seine PDZ-Domäne an die cytoplasmatische Region der EphrinB-Liganden binden und diese dephosphorylieren, wodurch das Phosphotyrosin-abhängige *signaling* in eine PDZ abhängige Signalweiterleitung konvertiert wird (Abb. 1.5.; Kullander et al., 2002). Über die Mechanismen des *reverse signaling* der A-Ephrine ist bisher weniger bekannt. Davy et al., 1999 haben gezeigt, dass Fyn, ein Vertreter der SFKs, mit EphrinA Liganden in den *lipid rafts* co-lokalisiert und in das *reverse signaling* involviert ist. Außerdem wurde berichtet, dass die Integrine durch die EphrinA-vermittelte Signalweiterleitung moduliert werden können (Davy et al., 2000; Huai et al., 2001).



1.5.3. Die Src-Familie-Tyrosin-Kinasen

Die Src-Familie der Protein-Tyrosin-Kinasen (SFKs) ist eine Gruppe von intrazellulären Tyrosin-Kinasen, deren Vertreter mit einer großen Vielzahl von Rezeptoren interagieren können und somit eine wichtige Funktion im *cross-talk* zwischen verschiedenen Signaltransduktionskaskaden unterschiedlicher Rezeptoren einnehmen. Es wurden bisher acht verschiedene Vertreter der SFKs bei Nagetieren identifiziert, von denen vier (Lyn, Fyn, Yes, Src) im Nervensystem exprimiert werden (Thomas et al., 1997). Die SFKs sind 52-62 kDa Proteine, die sich funktionell aus 6 Regionen zusammensetzen, die Src-homologe (SH)-4 Domäne, eine für jedes Mitglied spezifische Domäne, die SH3- und SH2-Domänen, und schließlich eine katalytische Domäne, an die sich ein kurzer regulatorsicher Schwanz anschließt (Brown et al., 1996). Die SH3- und SH2-Domänen stellen

Protein-Bindungsdomänen dar, wobei diese neben intermolekularen auch intramolekulare Interaktionen vermitteln, die zum Beispiel zur Stabilisierung der inaktiven Konformation der SFKs beitragen (Pawson, 1997; Xu et al., 1997).

Die SFKs sind in eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden verschiedener Rezeptoren, wie zum Beispiel den Integrinen (Kaplan et al., 1995), den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Diverse-Pierluissi et al., 1997), Cytokin-Rezeptoren (Taniguchi et al., 1995), den GPI-gekoppelten Rezeptoren (Stefanova et al., 1991; Thomas et al., 1992; Narisawa-Saito et al., 1996) und der großen Gruppe der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (Erpel et al., 1995) involviert. Die Interaktionen der SFKs mit den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen schließen die Phosphorylierung der SFKs, deren Assoziation mit den RTK, die Aktivierung der SFKs und die Phosphorylierung der RTKs ein. Funktionell sind sie bei dem Auswachsen von Neuriten (Beggs et al., 1994; Ignelzi et al., 1994; Suetsugu et al., 2002), der Faszikulation von Axonen (Morse et al., 1998) und bei der Modulation synaptischer Plastizität beteiligt (Takasu et al., 2002). Jüngere Arbeiten konnten überdies zeigen, dass SFKs auch die EphA-vermittelte Repulsion retinaler Ganglienzellen involviert sind (Knoll et al., 2004). Dass SFKs auch bei der Zellmigration eine Rolle spielen, zeigen Fibroblasten von Mäuseembryonen die kein c-Src, Fyn und Yes exprimieren und eine beeinträchtigte Integrin-abhängige Migration aufweisen (Klinghoffer et al., 1999). Außerdem sind SFKs bei der EGF-induzierten Migration von Zellen einer Ratten-Karzinoma-Zelllinie (Rodier et al., 1995), bei der Migration von Endothelzellen (Bell et al., 1992) und der Wanderung von T-Zellen (Ryan et al., 1995) beteiligt.

1.5.4. Das Eph/Ephrin-Paradoxon

Wie bereits erwähnt, können Interaktionen von Ephrinen und Eph-Rezeptoren repulsive und/oder attraktive Effekte auslösen. Die Entstehung adhäsiver Komplexe zwischen Liganden und Rezeptor-exprimierenden Zellen, die mit einer hohen Affinität binden, leuchtet zunächst ein. Doch wie kann Repulsion nach hochaffiner Rezeptor-Ligandenbindung stattfinden? Dieses Paradoxon bleibt nicht nur auf das Eph/Ephrin-System beschränkt, es betrifft alle Zell-Zell-Kontakt und Zell-ECM-Kontakt-abhängigen Bewegungsvorgänge, welche die Trennung adhäsiver Komplexe erfordern. Bisher wurden dazu in der Literatur für das Eph/Ephrin-System zwei Möglichkeiten diskutiert. Für die A-Ephrine wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem ein Metalloproteasen-vermitteltes Abschneiden der extrazellulären Domäne nach Rezeptorbindung stattfindet, was die Loslösung der Rezeptor- und Liganden-exprimierenden Zellen erlaubt (Hattori et al., 2000). Für das Eph/EphrinB-System wurde eine bidirektionale Endozytose von gesamten Rezeptor-Ligand Komplexen beobachtet, welche die Repulsion vermittelt (Zimmer et al., 2003).

1.5.5. Eph/Ephrin-Interaktionen während der Entwicklung

Die Ephrine und deren Rezeptoren spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Zellmigration, Axonlenkung und Zelladhäsion von Zellen während der Entwicklung. Repulsive Eph/Ephrin-Interaktionen verhindern das Einwandern von Zellen oder das Einwachsen von Axonen in Liganden-exprimierende Regionen und sind somit an der Wegfindung von Zellen und Axonen während der Entwicklung beteiligt (Flanagan et al., 1998; Wilkinson, 2000). B-Ephrine verhindern das Einwandern früher migratorischer Neural-Platten-Zellen in dorsale Bereiche und lenken die Migration somit entlang der ventralen Seite (Santiago et al., 2002). Das Paradebeispiel für die Axonlenkung durch repulsive Interaktionen stellt die Entwicklung der retinotektalen Projektionen dar. EphrinA2 und EphrinA5 werden in einem ansteigenden Gradienten von anterior nach posterior im Tektum und im *nucleus geniculatum laterale* (LGN) exprimiert, wohingegen die Expression des EphA3-Rezeptors in der Retina in einem komplementären Gradienten von temporal nach nasal abfällt (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995; Feldheim et al., 1998). Die graduelle Verteilung von Rezeptoren und Liganden trägt durch repulsive Interaktionen zur topographischen Projektion bei, wodurch nasale retinale Ganglienzellen mit weniger Rezeptoren in das posteriore Tektum projizieren, die Region mit einer hohen Ligandenexpression. Umgekehrt projizieren retinale Axone mit einer hohen Rezeptordichte in anteriore Bereiche des Tektums mit weniger Liganden (Drescher et al., 1995). Ephrine und deren Rezeptoren sind auch in topographische Projektionen anderer Regionen des Nervensystems involviert, wie die weit verbreitete Expression der Ephrine und deren Rezeptoren vermuten lässt (Mackarehshian et al., 1999; Liebl et al., 2003; Yun et al., 2003; Kudo et al., 2005; Niehage et al., 2005). EphrinA5/EphA5 Interaktionen sind an der korrekten Zielfindung thalamokortikaler Axone beteiligt. Die EphrinA5-Expression im somatosensorischen Kortex verhindert das Einwachsen der EphA5-exprimierenden Axone des limbischen Thalamus (Gao et al., 1998; Uziel et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass repulsive EphA7/EphrinA5 Wechselwirkungen die korrekte Wegfindung kortikothalamischer Projektionen vermitteln. Über- bzw. Unterexpression des EphA7-Rezeptors führte zur Verschiebung des Projektionsmusters im dorsalen Thalamus, wobei die Topographie thalamokortikaler Projektionen unbeeinflusst bleibt (Torii et al., 2005). Repulsive Eph-Rezeptoren vermitteln darüber hinaus die korrekte Ausbildung des kortikospinalen Traktes (Dottori et al., 1998) sowie die Entstehung des Corpus Callosum (Orioli et al., 1996). Axone, die einen Axontrakt wie den Corpus Callosum ausbilden, tendieren zur Ausbildung von Axonbündeln. Dieser Vorgang wird Axonfaszikulation genannt. Neben der Lenkung solcher Axonbündel durch Eph-Rezeptoren und deren Liganden, scheint das Eph/Ephrin System auch in den Prozess der Axonfaszikulation involviert zu sein (Winslow et al., 1995; Orioli et al., 1996).

Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass Eph/Ephrin-Interaktionen auch attraktive Effekte zur Folge haben können. Castellani et al., 1998 konnte erstmals zeigen, dass EphrinA5 zusätzlich zum repulsiven Effekt auch einen attraktiven Effekt auf verschiedene Populationen kortikaler Neurone haben kann (Castellani et al., 1998). So fördert EphrinA5 die Verzweigung von Axonen der Neuronenpopulation, die *in vivo* in der EphrinA5 exprimierenden Schicht 4 des Kortex terminieren. Weiterhin stellen B-Ephrine, die repulsiv auf die Migration früher Neural-Platten-Zellen wirken, ein

attraktives Signal für später migrierende Melanoblasten dar (Santiago et al., 2002). EphrinA5 hat außerdem einen attraktiven Effekt auf EphA4-positive Motoneurone des Hühnchenembryos (Eberhart et al., 2004). Ferner vermittelt EphrinA5 durch die Bindung an 3 verschiedene Splicevarianten des EphA7-Rezeptors, wobei zwei Varianten keine Kinasedomäne besitzen, die Verschmelzung der Neuralplatten zum Neuralrohr durch Zell-Zell-Adhäsion (Holmberg et al., 2000). Darüber hinaus können Eph/Ephrin-Interaktionen auch indirekt Zelladhäsionsvorgänge durch die Modulation von Zelladhäsionsmolekülen regulieren, wie es bereits für nicht-neuronale Zellen beschrieben wurde. Dabei können diese sowohl mit Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie L1 (Zisch et al., 1997b; Prevost et al., 2002) interagieren als auch an der Regulation von Integrin-abhängigen Zell-ECM-Interaktionen beteiligt sein (Miao et al., 2000; Huynh-Do et al., 2002). Es wurde dabei sowohl eine Förderung (Huynh-Do et al., 2002) als auch eine Hemmung der Integrin-Aktivität durch Eph/Ephrin *signaling* beobachtet (Miao et al., 2000). Wie bereits beschrieben, sind die Integrin-ECM-Interaktionen in migratorische Prozesse involviert. Da die Aktivierung der Eph-Rezeptoren die Integrin-Aktivität modulieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass das Eph/Ephrin-System auch die Integrin-abhängige Migration regulieren könnte, was für nicht-neuronale Zellen auch gezeigt worden ist. Die EphrinB1 Stimulation humaner endothelialer Aortazellen resultiert in einer EphB1-vermittelten Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit dieser Zellen (Nagashima et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EphrinA1 die Migration von Kapillarendothelzellen des Rindes induziert (Pandey et al., 1995).

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben worden ist, können Ephrine und deren Rezeptoren attraktive und repulsive Wirkungen auf verschiedene Populationen von Zellen haben. Weiterführende Arbeiten konnten darüber hinaus zeigen, dass A-Liganden auch eine differenzielle Wirkung auf gleiche Populationen von Neuronen haben können. So zeigen Axone retinaler Ganglienzellen differenzielle Antworten auf A-Liganden in Abhängigkeit von deren Konzentration (Hansen et al., 2004) und in Anhängigkeit von verschiedenen extrazellulären Matrix-Molekülen (Weinl et al., 2003). Darüber hinaus spielt der räumliche Kontext eine wesentliche Rolle. Wachsen limbische thalamische Neurone auf homogenen EphrinA5-enthaltenen Membranen aus, so bewirkt EphrinA5 eine gesteigerte Verzweigung der Axone. Liegen die EphrinA5-Membranen hingegen als alternierende Streifen mit einem Kontrollsubstrat vor, so hat EphrinA5 einen repulsiven Effekt auf die Axone des limbischen Thalamus (Mann et al., 2002). Somit können Ephrin-induzierte repulsive Antworten in attraktive Effekte und umgekehrt konvertiert werden, was die Komplexität der Regulation von entwicklungsbiologischen Prozessen durch Eph/Ephrin-Interaktionen noch weiter erhöht.

1.6. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche differenzielle Effekte von EphrinA5 auf kortikale Neurone des sich entwickelnden Telencephalons und die zu Grunde liegenden Mechanismen zu untersuchen. Es ist bereits viel über die Beteiligung der Ephrine und deren Rezeptoren bei der axonalen Lenkung und der Entstehung topographischer Karten bekannt. Untersuchungen, die hauptsächlich an nicht-neuronalen Zellen durchgeführt wurden, haben überdies gezeigt, dass das Eph/Ephrin System auch bei der Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Migration involviert ist. Da die Ephrine und Eph-Rezeptoren im sich entwickelnden Telencephalon eine räumlich und zeitlich hoch regulierte Expression aufweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von EphrinA5, einem wichtigen Vertreter der A-Ephrine, auf die Aggregation und Motilität von kortikalen Neuronen und auf die tangential Migration kortikaler Interneurone aus der medialen ganglionischen Eminenz untersucht.

Im ersten Projekt wurden die Effekte von EphrinA5 auf Aggregations- und Migrationsprozesse während der kortikalen Entwicklung anhand von zwei verschiedenen *in vitro*-Modellsystemen untersucht. Zum einen wurde das Wachstum kortikaler Neurone auf verschiedenen Substraten aus rekombinantem EphrinA5-Fc und der IgG1-Isotyp (Fc)-Kontrolle, in homogener Form und in alternierenden Streifen analysiert. Darüber hinaus wurden die Neurone des sich entwickelnden Kortex mit EphrinA5-transfizierten Fibroblasten co-kultiviert und untersucht. Time-lapse Aufnahmen sollten einen genaueren Einblick in die Aggregations- und Migrationsvorgänge geben. Anhand dieser *in vitro*-Assays und durch die Anwendung von immunhistochemischen, proteinbiochemischen und molekularbiologischen Methoden sollen folgende Fragen untersucht werden:

- Kann rekombinantes EphrinA5-Fc und membrangebundenes EphrinA5 transfizierter Fibroblasten an EphA-Rezeptoren kortikaler Neurone *in vitro* binden und diese aktivieren?
- Beeinflusst EphrinA5 die Aggregation und Motilität kortikaler Neurone?
- Wirkt EphrinA5 attraktiv und/oder repulsiv auf Kortex-Neurone?
- Welche Signaltransduktionswege sind an den möglichen differenziellen Effekten von EphrinA5 auf kortikale Neurone beteiligt?
- Wie kann Repulsion nach Kontakt von kortikalen Neuronen mit substratgebundenem EphrinA5-Fc vermittelt werden, nachdem in den angewendeten *in vitro*-Assays mit rekombinantem EphrinA5-Fc ein Abschneiden der extrazellulären Domäne der Ephrine durch Liganden-assoziierte Metalloproteasen (Hattori et al., 2000) ausgeschlossen werden kann? Existiert ein weiterer Mechanismus und lässt sich dieser auch auf die Repulsion nach Eph/Ephrin-Interaktionen zwischen Zellen übertragen?

Die Ephrine und Eph-Rezeptoren zeigen auch im basalen Telencephalon eine entwicklungsabhängige Expression. EphrinA5 wird beispielsweise während der tangentialen Migration kortikaler Interneurone in der Ventrikularzone der ganglionischen Eminenzen exprimiert (Marin et al., 2001a; Niehage et al., 2005). Daraus ergab sich die Zielstellung für das zweite Projekt, in dem eine Beteiligung von EphrinA5 an der Regulation der tangentialen Migration kortikaler Interneurone aus der medialen ganglionischen

Eminenz anhand von *in vitro* Assays untersucht wurde. Dazu wurde zum einen der Streifenassay eingesetzt und zum anderen wurde ein *in vitro*-Modellsystem verwendet, bei dem der Einfluss von EphrinA5 auf die tangential Migration kortikaler Interneurone in coronalen Schnitten näher charakterisiert werden sollte. Um migrierende Neurone der MGE *in vitro* zu visualisieren, wurden zwei verschiedene Methoden ausgewählt. Durch die Verwendung eines *cell-tracker*-Farbstoffes, der nach Aufnahme durch die Zellen in ein membranunlösliches, fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird, und die lokale Applikation dieses Farbstoffes in die VZ und SVZ der MGE von coronalen Schnitten, konnte das Migrationsmuster markierter MGE-Neurone *in vitro* bestimmt werden. Als eine weitere Methode zur Darstellung migrierender Interneurone *in vitro*, wurde eine homotypische Transplantation von MGE-Neuronen aus EGFP-markierten Embryonen auf coronale Wildtyp-Schnitte (*slice-overlay*) durchgeführt. Die Wirkung von EphrinA5 auf tangential migrierende kortikale Interneurone wurde *in vitro* durch die Manipulation mit rekombinantem EphrinA5-Fc näher untersucht. Auf der Grundlage dieser *in vitro*-Assays und weiterer molekularbiologischer, immunhistochemischer und proteinbiochemischer Untersuchungsmethoden sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Welchen Effekt hat substratgebundenes rekombinantes EphrinA5-Fc auf die Neurone der ganglionischen Eminenzen im Streifenassay?
- Welche der beiden aufgeführten Methoden eignet sich besser zur Darstellung migrierender Interneurone auf coronalen Schnitten *in vitro*? Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede bestehen zur tangentialen Migration kortikaler Interneurone *in vivo*?
- Wie gestaltet sich das Expressionsmuster von EphrinA5 und EphA-Rezeptoren *in vitro*?
- Welche Wirkung hat EphrinA5 auf die migrierenden kortikalen Interneurone? Welche Signaltransduktionswege könnten daran beteiligt sein?

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse des NOR-Stammes und EGFP-exprimierende Mäuse des Stammes C57BL/6J (Okabe et al., 1997) jeweils am Embryonaltag 14 (E14) verwendet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum mit regelmäßigem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden gehalten und gezüchtet. Für die korrekte Bestimmung der Altersangaben der Embryonen wurden die Mäuse von 15.00 Uhr bis 7.00 Uhr über Nacht verpaart, wobei der Folgetag als Embryonaltag 1 festgelegt wurde. Die folgenden Tage wurden dementsprechend als Embryontage E2-E21 bezeichnet. Das Gewicht der weiblichen Tiere wurde am Embryonaltag 1 bestimmt. Eine Schwangerschaft war sehr wahrscheinlich, wenn die Tiere am Embryonaltag 14 eine Gewichtszunahme um 7-12 g aufwiesen.

3.2. Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden NIH/3T3 Fibroblasten verwendet, die NIH Swiss-Maus-Embryonen entstammen. Die von Dr. R. Zhoo freundlicherweise zur Verfügung gestellten Zelllinien waren mit humanen Volllängen EphrinA5 transfiziert, das in einem retroviralen Vector (pLIG) kloniert wurde. Der Vector enthält zusätzlich ein Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen fusioniert mit einem β -Galactosidase Gen zur Ausbildung einer Geneticin G 418-Resistenz, wodurch eine Selektion der EphrinA5- exprimierenden Zellen möglich war. Als Kontroll-Zelllinie dienen NIH/3T3-Fibroblasten, die mit dem retroviralen Vector ohne Insert transfiziert wurden.

3.3. Wirtsbakterien

Als Wirtsbakterien zur Amplifizierung von Vektor-DNA wurde der *E.coli* –Stamm „XL1BlueMRF“ (STRATAGENE) verwendet. Dieser Bakterienstamm verfügt über eine Tetracyclin-Resistenz [tn10(tetr)] auf dem F'-Episom. Weiterhin zeichnet sich dieser Stamm durch seine Rekombinationsdefizienz, zur Vermeidung der Insertion der eingeschleusten DNA in die chromosomale DNA des Wirtes (recA) und zur Inaktivierung einer DNA-spezifischen Endonuklease zur Erhöhung der Ausbeute der Plasmidpräparation (endA1), aus.

3.4. Vektor

Der pEYFPmem (BIOSCIENCE)-Vektor kodiert ein Fusionsprotein bestehend aus den 20 N-terminalen Aminosäuren von Neuromodulin (GAP-43) und einer gelb-grün fluoreszierenden Variante des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Das Neuromodulin Fragment enthält eine Signalsequenz für eine posttranslationale Palmitoylierung der Cysteine 3 und 4, was den Einbau des EYFP in die Membran gewährleistet. Das Anregungsmaximum des EYFP liegt bei 513 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 527 nm. Die Expression des EYFPmem unterliegt einem CMV IE Promotor. Der Vector enthält zusätzlich eine Neomycin- und Kanamycin-Resistenz.

3.5. Zellbiologische Methoden

3.5.1. Steriles Arbeiten

Die Arbeit mit Zellkulturen und die Aufbereitung des Gehirngewebes für *in vitro*-Experimente fanden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in Laminarboxen statt. Alle verwendeten Pufferlösungen, Medien, Petrischalen, Reaktionsgefäße und Pipetten waren keimfrei. Benötigtes Präparierbesteck wurde im Hot-Beat-Sterilisator bei 260 °C für 10 s behandelt. Die Arbeitsplätze, Brutschränke, Puffer, Medien und Reaktionsgefäße für Primärkulturen und Zellkulturen wurden streng getrennt, um das Risiko einer Mycoplasmeninfektion der Zelllinien zu reduzieren.

3.5.2. Primärkulturen: kortikale Einzelzellen auf verschiedenen Substraten

Verwendete Substratproteine

Es wurde rekombinantes, geclustertes humanes EphrinA5-Fc oder geclusterte humane IgG₁ Isotyp Kontrolle (Fc-Protein), jeweils in PBS verdünnt, verwendet. Das rekombinante EphrinA5-Fc Protein, besteht aus der extrazellulären Domäne des humanem EphrinA5 (Met1-Asn203) und ist über eine DIEGRMD-Sequenz (Spaltstelle für Coagulationsfaktor X) an den Fc-Teil von humanem IgG1 (Pro 100-Lys 330) gekoppelt. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken liegt das Protein laut Datenblatt als Homodimer vor. Der Fc-Teil des rekombinanten EphrinA5-Fc erlaubt eine höhere Clusterung zu multimeren EphrinA5-Fc Komplexen durch die Verwendung von anti-humanen IgG Antikörper. EphrinA5-Fc wurde in einer Konzentration von 8 µg/ml, das Fc-Protein in einer Endkonzentration von 3 µg/ml eingesetzt.

Beschichtung der Deckgläser mit Substraten

Um EphrinA5-Fc zu multimerisieren, wurde ein Ziegen-anti-Mensch IgG (H+L) Antikörper im zehnfachen Überschuß eingesetzt (80 µg/ml). Zur Multimerisierung der IgG₁ Isotyp Kontrolle wurden 30 µg/ml Ziegen-anti-Mensch IgG (H+L) Antikörper verwendet. Je nach Anwendung wurde der Alexa 488 gekoppelte- oder der unmarkierte Ziege-anti-human IgG Antikörper zum Clustern der jeweiligen Proteine eingesetzt. Das Protein-Antikörper-Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert und danach bei 14.000 rpm für 5 min bei 20 °C abzentrifugiert, um eventuelle Unreinheiten zu entfernen. Für die Herstellung alternierender Streifen und homogener Substrate und wurden mit Salpetersäure gereinigte Deckgläser verwendet.

Homogene Substrate

Zur Herstellung homogener Substrate wurde ein Deckglas (12 x 14 mm; MENZEL-GLÄSER) in eine Petrischale gelegt, 100 µl die Protein-Antikörper-Lösung aufgebracht und jeweils ein weiteres Deckglas darüber geschichtet. Die Substrate wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 30 min inkubiert. Danach wurden die Deckgläser vorsichtig auseinandergenommen und jeweils in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Beschichtung mit Laminin und Poly-L-Lysin. Dazu wurden 100 µl Laminin (19,5 µg/ml) / Poly-L-Lysin (5 µg/ml) in GBSS auf ein Deckglas gegeben und ein

zweites wurde vorsichtig darüber geschichtet. Diese *Sandwiches* wurden für 1 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor dem Aufbringen der Kortex-Zellen wurden die beschichteten Deckgläser nochmals mit PBS gewaschen. Bestand das homogene Substrat ausschließlich aus Laminin (19,5 µg/ml) / Poly-L-Lysin (5 µg/ml), so wurden die *Sandwiches* ebenfalls 1 h bei 37 °C und 5 %-iger CO₂-Atmosphäre beschichtet, danach allerdings mit Bidest gewaschen und vor Gebrauch unter der Sterilbank getrocknet.

Alternierende Streifen

Zur Herstellung von alternierenden Streifen (laut Vielmetter et. al., 1990) zweier unterschiedlicher Substrat-Proteine wurden spezielle Silikon-Matrizes (hergestellt von Susanne Lang, MPI Thübingen) verwendet, deren parallel angeordnete Kanäle von 50 µm Breite durch 40 µm breite Balken voneinander getrennt sind. An beiden Enden der Längsseiten der Kanäle befand sich jeweils ein Eingangs- und Ausgangs-Kanal. Die Silikon-Matrizen wurden 10 min in 70 %igen EtOH gesäubert und 4 min in Bidest gekocht. Nach dem vollständigen Trocken unter der Sterilbank wurde ein Deckglas auf die Matrize über die Kanäle gelegt und 50 µl der Protein-Lösung 1 mit Alexa 488-markierten Antikörper injiziert. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden 3 x 50 µl PBS zum Waschen in die Kanäle injiziert. Danach wurde das Deckglas vorsichtig abgenommen, in eine Petrischale gelegt und unverzüglich mit 200 µl der zweiten Protein-Lösung (geclustert mit dem unmarkiertem Ziege-anti-Mensch IgG Antikörper) überschichtet. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Deckglas mit PBS gewaschen und mit 200 µl Laminin (19,5 µg/ml) / Poly-L-Lysin (5 µg/ml) in GBSS überschichtet und für 1 h im Brutschrank inkubiert (bei 37 °C und 5 % CO₂). Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Kortexzellen auf die Streifen-Substrate aufgebracht.

Präparation dissoziierter kortikaler Neurone

Für die Präparation kortikaler Einzelzellen wurden Embryonen des Embryonaltages 14 (E14) verwendet. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Muttertier wurde durch intraperitoneale Injektion mit einer Überdosis 7 %igen Chloralhydrates (1,5 ml) getötet, die Embryonen entnommen, die somatosensorischen Kortizes auf Eis in GBSS/Glukose präpariert und in HBSS/Glukose bei 4 °C gesammelt. Das Gewebe wurde mit 0,05 %igem Trypsin bei 37 °C für 17 min anverdaut. Zum Stoppen der Trypsinreaktion wurde das HBSS/Glukose-Trypsin Gemisch vorsichtig entfernt und 1 ml Kulturmedium mit 10 % FBS dazugegeben. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer abgerundeten Pasteurpipette und anschließendem Durchsatz durch ein Maschennetz (Maschengröße 200 µm x 200 µm) wurden die Neurone vereinzelt. Auf homogene Substrate wurden 150 Zellen/mm², auf Streifen-Substrate 300 Zellen/mm² aufgebracht. Die kortikalen Einzelzellen wurden für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend mit 4 % PFA in PBS fixiert.

Stimulierung kortikaler Neurone mit rekombinantem EphrinA5-Fc im Medium

Für den Nachweis der Bindungsstellen für rekombinantes EphrinA5-Fc wurden die Neurone 1 bis 2 Tage *in vitro* auf Laminin / Poly-L-Lysin kultiviert und anschließend für 30 min bei 37 °C mit 8 µg/ml EphrinA5-Fc, geclustert mit 80 µg/ml Alexa 488-markiertem Ziege-anti-Mensch-IgG, im Medium behandelt. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA in PBS.

Zusatz des Src-Kinase Inhibitors PP-2 im Medium

Die Zugabe der Peptide PP-2 bzw. PP-3 in das Medium der kortikalen Kulturen auf homogenen Substraten und im Streifen-Assay erfolgte mit einer jeweiligen finalen Konzentration von 5 μM über 2 d *in vitro*. Nach 1 d erfolgte die Substitution der Hälfte des Mediums durch vorgewärmtes Medium mit 5 μM des entsprechenden Peptides.

3.5.3. Co-Kulturen aus NIH/3T3 Fibroblasten und kortikalen Neuronen

Zur Untersuchung der EphA/EphrinA-Interaktionen zwischen Zellen wurden EphA-exprimierende kortikale Neurone zusammen mit EphrinA5-exprimierenden NIH/3T3 Fibroblasten co-kultiviert. Als Kontrolle dienten NIH/3T3 Zellen, die mit einem Vektor ohne Insert für EphrinA5 transfiziert waren.

Auftauen von Zellkulturen (NIH Swiss Maus Fibroblasten)

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellkulturen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut, in 9 ml Zellkulturmedium gewaschen und bei 20 °C, 800 U/min für 8 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in eine Petrischale mit 10 ml Medium überführt und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

Passage der Zellkulturen

Die Zellen wurden kurz mit warmen PBS (37 °C) gewaschen und 3 min mit 1 ml 0,25 %-igen Trypsin behandelt. Das Abstoppen der Trypsinreaktion erfolgte durch 4 ml Zellkulturmedium mit 10 % FBS. Das durch Zentrifugation (800 U/min, 20 °C, 8 min) erhaltene Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in vier neue Petrischalen mit 10 ml Medium übertragen. Die Inkubation von EphrinA5-transfizierten Zellen in Medium mit 0,4 % Geneticin G418 erfolgte für mindestens 5 Tage, um eine Selektion der Zellen zu gewährleisten.

Einfrieren von Zellkulturen

Das Einfrieren der Zellen entspricht im Wesentlichen der Passage, allerdings erfolgte die Resuspension des Zell-Pellets mit 1 ml kaltem Einfriermedium (4 °C) pro Petrischale. Die Zellen wurden bei -80 °C in Kryo-Röhrchen in einer Isopropanol-Kammer eingefroren, was ein langsames Herunterkühlen (1 °C/min) ermöglichte. Nach 24 h wurden die eingefrorenen Zellen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Herstellung der Co-Kulturen aus Fibroblasten und Neuronen

Die Fibroblasten wurden entsprechend des Passage-Protokolls von der Petrischale abgelöst, und in 1 ml Medium resuspendiert und auf mit Laminin (19,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) / Poly-L-Lysin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtete Deckgläser (20 Zellen/ mm^2) aufgebracht. Die Zellen adhärten während 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 . In dieser Zeit erfolgte die Präparation kortikaler Neurone. 300 Neurone/ mm^2 wurden auf die mit den Fibroblasten beschichteten Deckgläsern aufgebracht und bei 37 °C und 5 % CO_2 für 1 bzw. 2 Tage kultiviert. Als Medium wurde das Kulturmedium für Neurone verwendet. Die Fixation erfolgte in 4 % PFA in PBS.

3.5.4. Primärkulturen: Darstellung migrierender Neurone in coronalen Schnitten

Präparation coronaler Gehirnschnitte

Es wurden Embryonen des Embryonaltages 14 (E14) des NOR-Stammes verwendet. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Muttertier wurde durch intraperitoneale Injektion mit einer Überdosis 7 %igen Chloralhydrates (1,5 ml) getötet, die Embryonen entnommen und die Gehirne in GBSS/Glukose präpariert. Die Gehirne wurden coronal mit einem *Tissue-Chopper* in 225 µm dicke Schnitte gehackt, in GBSS/Glukose gesammelt, und für 30 min bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Schnitte auf mit Poly-L-Lysin (10 µg/ml) beschichtete Deckgläser aufgebracht und in kleinen Petrischalen (35 mm Durchmesser) mit 450 µl Kulturmedium für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend mit 4 % PFA in PBS fixiert. Nach 1 Tag *in vitro* erfolgte ein Mediumwechsel, 100 µl Medium wurden durch 150 µl frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

Markierung migrierender Zellen mit Cell tracker-Farbstoff

Beschichtung von Wolframkugeln mit Cell tracker-Farbstoff

Die 10 mM *Cell Tracker green* (C2925) Stocklösung wurde mit Dichlormethan auf 1 mM verdünnt. 50 mg Wolframkugeln (0,7 µm Durchmesser) wurden flach auf einem Objektträger verstrichen, danach wurde 100 µl der verdünnten *Cell Tracker green* (C2925) Lösung dazugegeben und mit einem Spatel vermischt. Nach dem Verdampfen des Dichlormethans wurden die beschichteten Wolframkugeln bei 4 °C gelagert.

Applizieren der Wolframkugeln auf coronale Schnitte

Die präparierten coronalen Gehirnschnitte wurden 1 h nach Aufbringen auf die Deckgläser bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium komplett abgenommen und die Wolframkugeln mit dem Farbstoff mit Hilfe einer Glaskapillare in die Ventrikularzone der Gehirnschnitte appliziert. Nach 30 min Inkubation in serumfreiem Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium durch Kulturmedium mit Serum ersetzt und die Gehirnschnitte für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Homotypische Transplantation von EGFP-Explantaten des MGE auf Wildtyp-Gehirnschnitte

Es wurden Wildtyp Weibchen mit EGFP-heterozygoten Männchen (oder umgekehrt) des Stammes C57BL/6J verpaart, wodurch EGFP heterozygote als auch Wildtyp-Nachkommen entstanden (Abb. 3.5.4. A). Es wurden embryonale Tiere des Embryonaltages 14 verwendet, deren abgetrennte Köpfe unter UV-Licht in Wildtyp und EGFP-Tiere separiert wurden. Die Gehirne wurden jeweils präpariert und mit dem *tissue-Chopper* coronal geschnitten (Abb. 3.5.4. B). Nach Aufbringen der Wildtyp-Gehirnschnitte (225 µm) auf Deckgläser wurden diese mit 450 µl Kulturmedium überschichtet und 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und Explantate aus der Ventrikularzone der MGE der EGFP-Gehirnschnitte herausgeschnitten und homotypisch auf die entsprechenden Wildtyp-Schnitte transplantiert (Abb. 3.5.4. C). Die Inkubation erfolgte für 2 Tage *in vitro* mit 450 µl Medium.

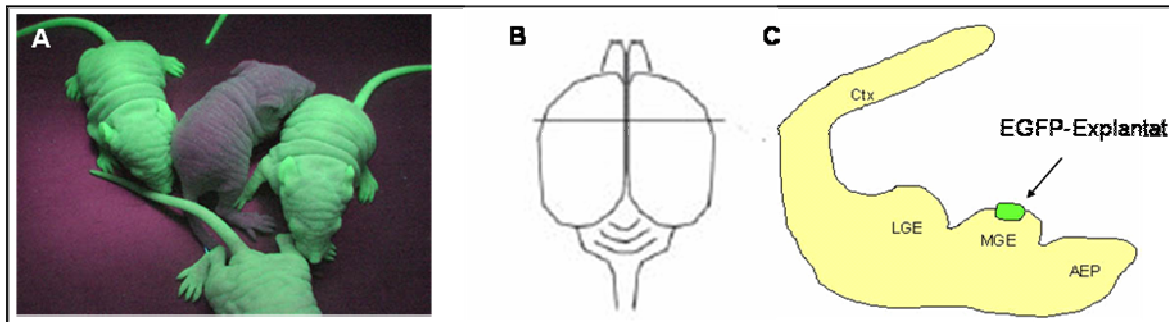


Abb. 3.5.4.: Homotypische Transplantation von Explantaten aus EGFP-Embryonen auf Wildtyp-Schnitte. (A), Nachkommen einer heterozygoten EGFP-Maus, die mit einer Wildtyp-Maus verpaart wurde. (B), schematische dorsale Ansicht eines Embryonengehirns mit coronaler Schnittebene. (C), Schematische Darstellung der Lokalisation eines EGFP-Explantates nach Transplantation in einen Wildtypschnitt einer Hemisphäre.

Behandlung der Gehirnschnitte mit rekombinanten EphrinA5-Fc

Die Gehirnschnitte wurden mit dem rekombinanten EphrinA5-Fc Protein in einer Konzentration von 5 µg/ml im Medium behandelt. Monomeres EphrinA5 wurde durch Abspalten des IgG1 (Fc-Teil) mit dem Coagulationsfaktor X erhalten (siehe Abschnitt 3.7.3.). EphrinA5 bindet an EphA2-A8 (Pasquale, 1997; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998).

Behandlung der Gehirnschnitte mit PP2 im Medium

Analog der kortikalen Primärkulturen wurden 5 µM PP2 im Medium eingesetzt. Nach 1 Tag *in vitro* wurde 100 µl Medium abgenommen und durch 150 µl frisches Medium mit 5 µM PP2 ersetzt.

3.6. Immunohistochemie

3.6.1. Immunohistochemische Markierungen an kortikalen Einzelzellen

Nach der Fixierung der Kulturen mit 4 % PFA in PBS wurden die Deckgläser 3 x 15 min mit Waschpuffer bei RT gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Zellen anschließend 15 min mit Blockierungsreagenz bei RT behandelt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper entsprechend verdünnt im Blockierungsreagenz erfolgte in einer feuchten Kammer, entweder über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT. Danach wurden die Zellen 3x15 min mit Waschpuffer behandelt (RT) und für 50 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, verdünnt in Blockierungsreagenz, bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach folgten zwei weitere Waschrunde mit Waschpuffer für jeweils 15 min bei RT. Abschließend wurden die Zellen für 15 min mit 0,05 µg/ml DAPI in PBS inkubiert, kurz mit Bidest gewaschen und mit Mowiol/n-Propyl-Gallat eingedeckelt. Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

3.6.1. Immunohistochemische Markierungen der EphrinA5-Fc Bindestelle an coronalen Schnitten

Die coronalen Schnitte wurden unter 3.5.4. beschrieben für 2 Tage *in vitro* mit EphrinA5-Fc behandelt und anschließend mit dem anti-human IgG in einer Verdünnung von 1:200 für 90 min bei 37°C im Kulturmedium mit 10 % Ziegennormalserum inkubiert. Dann wurden die Schnitte 6 x 5 min in modifizierter HBSS gewaschen und mit 4 % PFA für 2 h fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zerstörung endogener Phosphatasen durch die Inkubation bei 65 °C für 1 h. Nach einmaligem Waschen in Puffer B3 wurden die Schnitte in dem Farbreaktionspuffer bis zur entsprechenden Färbeintensität inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Waschen mit PBS. Die Schnitte wurden kurz in Bidest gewaschen und in Mowiol/n-Propyl-Gallat eingedeckelt. Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

3.7. Proteinbiochemische Methoden

3.7.1. Immunpräzipitation von Gehirngewebe mit EphrinA5-Fc und Fc-Protein

Das embryonale kortikale Gewebe (E14) wurde in GBSS/Glukose auf Eis präpariert und in HBSS/Glukose gesammelt (4 °C). Die Präparation von Einzelzellen erfolgte ausschließlich mechanisch. Dazu wurde das Gewebe mittels einer an der Spitze verengten und abgerundeten Pasteurpipette zerkleinert und mit anschließendem Durchsatz durch ein Maschennetz (200 x 200 µm) weiter vereinzelt. Das Gewebe wurde zu gleichen Teilen auf 2 Reaktionsgefäße verteilt und mit jeweils 10 µM PP-2 bzw. PP-3 für 25 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz anzentrifugiert (30 s, 2000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 10 min bei 4 °C im Ultraschallbad homogenisiert. Die Homogenate wurden 30 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durchmischt. Im Anschluss daran erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben (2 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde für 1 h mit 30 µl vorgewaschener Protein-A-Sepharose bei 4 °C auf einem Rotor präinkubiert. Nach Zentrifugation bei 2 min, 13.000 rpm, 4 °C wurde der Überstand für die Immunpräzipitation weiterverwendet. Es wurden 8 µg/ml EphrinA5/Fc bzw. 8 µg/ml Fc eingesetzt und über Nacht auf einem Rotor bei 4 °C präzipitiert. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 15 µl Protein-A-Sepharose pro Ansatz zugegeben und für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Proben wurden 3 x 5 min mit Lysepuffer ohne Inhibitoren gewaschen und jeweils bei 13.000 rpm und 4 °C für 1 min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese).

3.7.2. SDS-PAGE und Darstellung im Western Blot

Alle für die SDS-PAGE verwendeten Gele, Puffer und Reagenzien wurden kommerziell von INVITROGEN erworben. Jedes Proben-Pellet wurde in 4 x Probenpuffer und 10 x Reduzierungssagenz resuspendiert. Als Marker diente der ECL-Protein Molekulargewichtsmarker mit 6 verschiedenen biotinylierten Proteinen. Die Proben wurden 10 min bei 70 °C denaturiert. Es wurden kommerzielle 4-12 %ige Bis/Tris Gradientengele in Kombination mit MOPS-Laufpuffer verwendet. Die angelegte Spannung betrug 200 V, was eine Stromstärke von 125 mA/Gel erlaubte. Das Blotten der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels Fastblot B43. Das Gel und die Nitrozellulosemembran wurden 10 min vor Gebrauch mit Blotting-Puffer bei 4 °C equilibriert. Die Nitrozellulosemembran wurde auf mit Blotting-Puffer durchnässtes 3 MM-Filterpapier auf die ANODE gelegt, das Gel vorsichtig und luftblasenfrei darüber gelegt und mit 3 MM-Filterpapier überschichtet. Die Abdeckung fungierte als Kathode. Es wurde eine Stromstärke von 270 mV angelegt und die Proteine unter Wasserkühlung für 30 min auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Danach wurden die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran entweder für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit NC-Puffer / 0,05 % Tween blockiert. Alle weiteren Inkubationschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Markerstreifen wurden abgeschnitten und separat in NC-Puffer / 0,05 % Tween gewaschen und weiterbehandelt. Primär- und Sekundärantikörper wurden jeweils in NC-Puffer / 0,05 % Tween verdünnt eingesetzt. Primärantikörper wurden für 3 h bei RT, die Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurden für 50 min bei RT inkubiert. Inzwischen wurde die Nitrozellulosemembran 3 x 15 min mit NC-Puffer / 0,05 % Tween gewaschen. Während der Inkubation der Sekundärantikörper wurden die Markerstreifen für 30 min mit ABC-Reagenz behandelt. Der ABC-Komplex, bestehend aus Avidin (Reagenz A) und biotinylierter Peroxidase (Reagenz B), wurde jeweils frisch aus einem Tropfen Reagenz A und einem Tropfen Reagenz B in 6 ml NC-Puffer / 0,05 % Tween hergestellt. Markerstreifen und Nitrozellulosemembran wurden 3 x 15 min mit NC-Puffer mit 0,05 % Tween gewaschen und anschließend im ECL-Gebrauchsreagenz für jeweils 1 min bei RT inkubiert. Durch Oxidation des Substrates wurde eine Lichtemission erzeugt (Chemolumineszenz), die auf einem Röntgenfilm in einer Expositions-kammer abgebildet wurde. Das Maximum der Lichtemission liegt in einem Zeitfenster von 5-20 min. Die Filme wurden mit einer Expositionszeit von 30 s bis 5 min belichtet, anschließend in einer Dunkelkammer mit KODAK-D19-Entwickler entwickelt, kurz im Unterbrecherbad gespült, in einer Fixiersalzlösung fixiert, abschließend gewässert und zum Trocknen aufgehängt.

3.7.3. Abspaltung des IgG₁ (Fc)-Teiles von EphrinA5-Fc

Unter Verwendung des CoagulationsfaktorsX konnte der Fc-Teil des rekombinanten EphrinA5-Fc abgespalten werden. Die Spaltstelle des CoagulationsfaktorsX (IEGR) ist in den Polypeptidlinker des rekombinanten Proteins eingebaut (IEGRMD). Es wurden 7,5 µg CoagulationsfaktorsX zusammen mit 50 µg EphrinA5-Fc in FaktorXa Puffer mit 5 mM CaCl₂ und 1 mM NaN₃ zur Spaltung eingesetzt und 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit Microcon-Röhrchen YM3 für 1,5 h bei 14.000 rpm und 4 °C aufkonzentriert (Ausschlussgrenze von 3000 Da). Der Erfolg der enzymatischen

Abspaltung wurde mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem *MicroBC Assay-Protein Quantifizierungs Kit* analog der Gebrauchsanweisung durchgeführt.

SDS-Page mit Silberfärbung

Die SDS-PAGE wurde analog Abschnitt 3.7.2. durchgeführt. Als Marker diente der SDS-Molekulargewichtsmarker von SIGMA (M5630). Die Silberfärbung wurde mit dem *SilverQuestTM Silver Staining Kit* von INVITROGEN analog der Gebrauchsanleitung durchgeführt. In Abb. 3.7.3. ist das Ergebnis der Abspaltung des IgG₁-Teiles von EphrinA5-Fc dargestellt. Das theoretisch zu erwartende Molekulargewicht des EphrinA5-Fragmentes (Met 1-Asn 203) liegt bei ungefähr 21 kDa, das theoretische Molekulargewicht des IgG₁ (Fc)-Teils liegt bei ungefähr 26 kDa. Das Molekulargewicht des Ausgangsproteins ist mit 48,6 kDa angegeben, aufgrund von Glykosylierungen erscheint die Bande in der SDS-PAGE unter reduzierten Bedingungen laut Datenblatt allerdings bei 50-55 kDa. Das erklärt auch das Erscheinen der Spaltprodukte bei einem höheren Moleklargewicht in der SDS-PAGE. Die Spaltung von EphrinA5-Fc verlief nahezu vollständig.

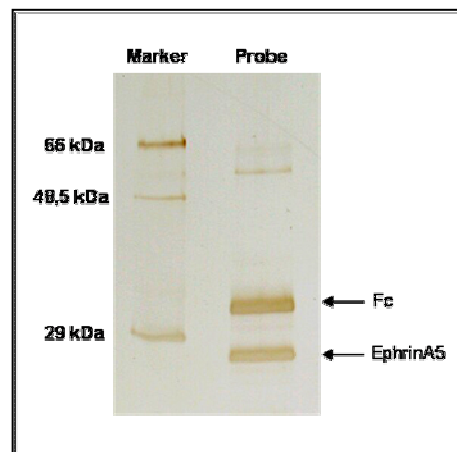


Abb. 3.7.3.: Ergebnis der Abspaltung des IgG₁ von EphrinA5-Fc nach SDS-PAGE und Silberfärbung. Die Spaltprodukte sind deutlich zu erkennen, wobei die obere Bande den IgG₁ (Fc)-Teil, die untere Bande das EphrinA5-Fragment darstellt.

3.8. Molekularbiologische Methoden

3.8.1. Transfektion von Neuronen mittels Elektroporation

Amplifizierung von pEYFPmem-Vektors in E.coli

Zur Amplifizierung des pEYFPmem Vektors, der freundlicherweise von Susan Amara zur Verfügung gestellt wurde, wurde der Vektor in kompetenten *E.coli* Bakterien des Stammes XL1Blue elektroporiert. Zu 50 µl kompetenter Bakteriensuspension wurden 1 ng Vektor-DNA gegeben, kurz durchmischt und in einer vorkühlten Einwegelektroporationsküvette mit einem Plattenabstand von 2 mm in die Elektroporationskammer gebracht. Es wurden 2 Pulse bei 2500 V über 8 ms angelegt (Elektroporator 2510, EPPENDORF). Danach wurde sofort 1 ml vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium in die Küvette gegeben, 2 x aufgezogen und sofort in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 37 °C im Schüttler für 30 min inkubiert. Die Bakterien wurden 1:100, 1:1000 und 1:10000 mit SOC-Medium verdünnt, wovon je 100 µl jeder Verdünnung mit Hilfe eines abgeflamten Trizalk-Spatels unter Drehen auf die Platten aufgebracht und über Nacht bei 37 °C umgedreht kultiviert wurden. Am nächsten Morgen erfolgte die Animpfung von 5 ml vorgewärmtem LB-Medium mit 30 g/ml Kanamycin mit einer Bakterienkolonie und die Inkubation für 8 h bei 37°C° und 200 rpm auf einem Schüttler. Danach wurden 100 µl der 5 ml-Bakteriensuspension in 50 ml LB-Medium mit 30 g/ml Kanamycin umgeimpft und 16 h bei 200 rpm auf einem Schüttler bei 37 °C kultiviert.

Isolierung der Vektor-DNA mittels Quiagen MIDI Prep-Kit

Die Vektor-DNA wurde mittels Quiagen MIDI Prep-Kit laut Herstellerangaben isoliert. Die einzige Abweichung vom Herstellerprotokoll bestand im Lösen des mit Isopropanol gefällten und mit EtOH gewaschenen DNA-Pellets in 10 mM Tris-HCl (pH=8,0) auf Eis (30 min) anstatt in TE-Puffer. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der amplifizierten Vektor-DNA erfolgte durch optische Dichte-Messung im Photospektrometer. Dazu wurde die Absorption der Vektor-DNA (100-fach verdünnt in Wasser) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm erlaubt eine Aussage über die Reinheit der DNA. Ein Quotient zwischen 1,7 und 2,0 bedeutet einen hohen Reinheitsgrad. Zur Berechnung der Konzentration der DNA wurde folgende Beziehung verwendet: OD (260 nm) = 1 entspricht 40 ng/µl.

Restriktionsverdau zur Kontrolle der amplifizierten Vektor-DNA

Zur Kontrolle der Vektor-DNA wurde ein Restriktionsverdau mit Pst-1 laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Der pEYFPmem-Vektor besitzt zwei definierte Spaltstellen für Pst-1, was in zwei Spaltprodukten der Größe 4484 bp und 309 bp resultiert. Die Spaltprodukte wurden mit DNA-Elektrophorese (1 % Agarose in TBE-Gel) überprüft. Das 1 % Agarose-Gel enthielt 5 µl/100 ml Ethidiumbromid. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Im UV-Licht konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografiert werden. Abb. 3.8.1. zeigt ein Gelbild, auf dem der Restriktionsverdau von zwei Ansätzen (Probe 1 und 2) in den beiden linken Spuren dargestellt ist, bei denen die kleine Bande kurz über 300 bp und die große weit über 3000 bp liegt, was den theoretisch erwarteten Spaltprodukten entspricht (309 bp und 4484 bp). In den beiden rechten Spuren ist jeweils die

unverdaute Vektor-DNA (Probe 1 und 2) aufgetragen, die als Supercoil vorliegt, somit schneller im Gel läuft und deshalb bei einer kleineren Größe erscheint.

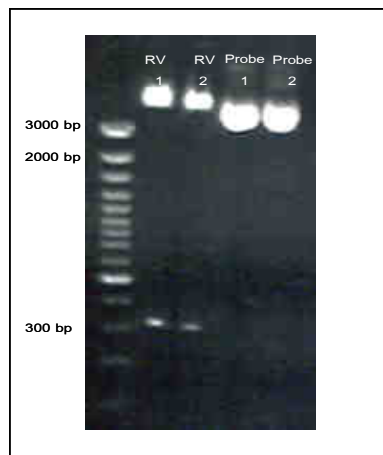


Abb. 3.8.1.: Kontrolle der isolierten EYFPmem Vektor-DNA (supercoiled) im 1 %-igen Agarose-Gel. Probe 1 und 2 stellen jeweils zwei Parallelansätze dar, die mittels Restriktionsverdau (RV 1 und RV 2) unter Verwendung des Restriktionsenzym Pst-1 verdaut wurden. Der Restriktionsverdau des Vektors resultiert theoretisch in zwei Spaltstücken mit jeweils 309 bp und 4484 bp, die auch im Gel nachgewiesen werden konnten. Der Vektor liegt unverdaut als Supercoil vor, läuft somit schneller im Gel und erscheint bei einer geringeren Größe.

Elektroporation kortikaler dissoziierter Neurone mit EYFPmem Vektor

Um kortikale dissoziierte Neurone mit der pEYFPmem Vektor-DNA zu transfizieren, wurde ebenfalls die Methode der Elektroporation gewählt. Die kortikalen Neurone wurden wie bereits beschrieben präpariert und dissoziiert. Im Anschluss an das Stoppen der Trypsinreaktion mit 1 Kulturmedium, wurden die Neuronen kurz abzentrifugiert (1500 rpm, 4 °C, 5 min), in 150 µl eiskaltem Elektroporationspuffer resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette mit einem Plattenabstand von 0,2 cm überführt. Anschließend wurde 50 µg Vektor-DNA zugegeben. Das Gemisch wurde 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde ein Puls mit einer Pulslänge von 0,1 ms und einer Spannung von 700 V ausgelöst. Danach wurde sofort 1 ml kaltes Kulturmedium (4 °C) dazugegeben und die Küvette mit den Zellen für 10 min auf Eis gestellt. Die Neurone wurden mit einer Zelldichte von 300 bzw. 600 Zellen/ mm² Neurone zusammen mit Fibroblasten (20 Zellen/mm²) aufgebracht und für 2 d bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.8.2. RT-PCR zum Nachweis der EphrinA5-Expression der NIH/3T3-Fibroblasten

Arbeiten unter Ribonuklease (Rnase)-freien Bedingungen

Die Arbeit mit RNA erfordert gesonderte Bedingungen, um die Ribonuklease-Aktivität so gering wie möglich zu halten. Es gab gesonderte Arbeitsplätze für den Umgang mit RNA, an denen nur mit Handschuhen gearbeitet wurde. Alle verwendeten Glasgefäße und Metallgeräte wurden für 3 h auf 180 °C erhitzt. Es wurden gesonderte Chemikalien und sterile Einwegmaterialien verwendet. Wasser wurde mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, unter dem Abzug für mindestens 30 min gerührt und anschließend autoklaviert, um das überschüssige DEPC zu zerstören. Alle verwendeten

Puffer und Lösungen, die bei der Arbeit mit RNA zur Anwendung kamen, wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

Präparation von totaler RNA

Die Isolierung der totalen RNA erfolgte mit Trizol. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinium-Isothiocyanat. Beide Substanzen denaturieren Proteine, die in diesem Zustand sehr hydrophob sind und sich somit sehr gut in Phenol lösen. Die RNA verbleibt in der wässrigen Phase. 3 ml Trizol wurden pro Zellkulturschale mit Kontroll- und EphrinA5-transfizierten Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit einem Schaber abgelöst. Das Trizol-Zell-Gemisch wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, und mit einer Einwegspritze und einer 0,9 mm Kanüle homogenisiert (10 x). Das Homogenat wurde anschließend für 10 min, bei 12.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand mit darin enthaltener RNA wurde abgenommen und 5 min bei RT stehen gelassen, das Pellet wurde verworfen. Durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro eingesetzten Milliliter Trizol erfolgte die Phasentrennung. Der Ansatz wurde für 15 s geschüttelt und danach 15 min, bei 12.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der enthaltenen RNA wurde abgenommen. Zur Präzipitation der RNA wurden 0,5 ml Isopropylalkohol pro eingesetzten Milliliter Trizol dazugegeben und das Gemisch für 10 min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C wurde die RNA pelletiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit mindestens 1 ml 75 % Ethanol pro eingesetzten Milliliter Trizol und nachfolgender Zentrifugation (5 min, 7500 g und 4 °C) gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die RNA an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser für 30 min auf Eis gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung wurde durch optische Dichte-Messung im Photospektrometer analog der optischen Dichte-Messung der pEYFPmem Vektor-DNA durchgeführt. Mittels RNA-Gelelektrophorese wurde die Intaktheit der isolierten totalen RNA überprüft (0,8 % Agarose-Gel in TAE-Puffer mit 0,05 µl/ml Ethidiumbromid). Die Feldstärke wurde auf 2,7 V/cm festgelegt. Unter UV-Licht wurden die RNA-Banden (18S und 26S rRNA) sichtbar, die als Kriterium für die Intaktheit der RNA gelten.

Reverse Transkription

Es wurde der spezifische antisense Primer Efn A5'4 (1 pmol), mit der Sequenz (5' → 3') GCT ATA ATG TCA AAA GCA TCG CC verwendet. Es wurden jeweils 500 ng mRNA eingesetzt und die RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase von Fermentas laut Protokoll verwendet. Der Ansatz wurde im PCR-Gerät (Mastercycler Gradient, EPPENDORF) für 1 h bei 42 °C (reverse Transkription) und 10 min bei 72 °C (Inaktivierung des Enzyms) inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf 4 °C gekühlt und direkt für die PCR weiterverwendet. Die verbleibende cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der cDNA wurden der Efn A5'4 Primer (Sequenz siehe reverse Transkription) und der Efn A5'1 Primer mit der Sequenz (5' → 3') ATG TTG CAC GTG GAG ATG TTG AC verwendet. Beide Primer erkennen je eine spezifische Sequenz von 23 Nucleotiden im humanen EphrinA5 und schließen 642 Nucleotide ein. Somit sollte durch die Primer eine cDNA amplifiziert werden, die

insgesamt 688 bp enthält. Es wurden 5 µl der cDNA in einen Reaktionsansatz von 25 µl mit folgenden Bestandteilen (mit den jeweiligen Endkonzentrationen) zugegeben:

0,2 mM	dNTP-Mix
1,5 X	<i>Taq</i> -Puffer
1,5 mM	MgCl ₂
0,8 pmol / µl	Efn A5´4 Primer
0,8 pmol / µl	Efn A5´1 Primer
0,004 U / µl	HotStar <i>Taq</i> -Polymerase

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Deckel	105 °C	
Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> -Polymerase	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	53 °C	30 s
Elongation	72 °C	1 h 30 min; 25 Zyklen
Hold	8 °C	

Das Ergebnis der PCR wurde mit einem 1 % igem Agarose in TBE-Gel überprüft, was in Abb. 3.8.2. dargestellt ist. Die amplifizierte cDNA der EphrinA5-transfizierten Fibroblasten zeigte im Gel eine Bande, die kurz über der 650 bp-Bande des DNA-Marker liegt und somit der theoretisch erwarteten cDNA von EphrinA5 entspricht. In der Kontroll-Spur erscheint keine Bande.

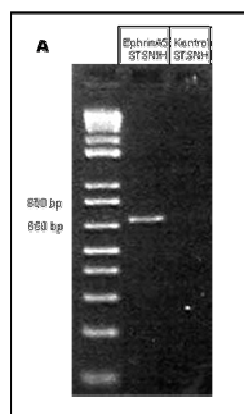


Abb. 3.8.2.: Die RT-PCR der RNA von EphrinA5-transfizierten und Kontroll-Fibroblasten unter Verwendung spezifischer Primer für EphrinA5 konnte zeigen,

3.8.3. *In situ*-Hybridisierung an dicken Schnitten

Es wurde unter Ribonuklease-freien Bedingungen, wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, gearbeitet. Die Schnitte (225 µm) wurden sofort nach der Präparation, nach 2 h und 48 h *in vitro* in 4 % PFA in PBS für 4 h unter Schütteln auf Eis und anschließend über Nacht bei 4 °C mit 4 % PFA in PBS fixiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Proben mit einer Methanolreihe dehydriert (25 %, 50 %, 75 %, 100 % in PBS) und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die Schnitte wurden nach dem Auftauen mit 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBS rehydriert und dreimal je 5 min mit PBS/0,1 % Tween gewaschen. Anschließend wurden die Proben 30 min mit 6 % H₂O₂ behandelt und dreimal je 5 min mit PBS/0,1 % Tween gewaschen. Die Schnitte wurden mit 10 µg/ml Proteinase K für 10 min anverdaut. Der Verdau wurde mit 2 µg/ml Glycin gestoppt. Danach wurden die Proben dreimal je 5 min mit PBS/0,1 % Tween gewaschen und für 15 min in 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd in PBS/0,1 % Tween nachfixiert. Die Proben wurden 3x5 min in PBS/0,1 % Tween gewaschen. Danach wurden die Schnitte 5 min in 50 % PBS/0,1 % Tween und 50 % Hybridisierungslösung, anschließend in 100 %iger Hybridisierungslösung gewaschen. Die Proben wurden dann in frischer Hybridisierungslösung bei 65 °C für 3 h prähybridisiert. Die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden, von Ronny Niehage, Sandra Barchmann und Katharina Merz zur Verfügung gestellt, wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und in einer finalen Konzentration von 300 ng/ml zu den Proben gegeben und über Nacht bei 70°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung durch die Posthybridisierungslösung ersetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde je 10 min bei 70 °C mit Posthybridisierungslösung / 2x SSC mit 1 % SDS in folgenden Verhältnissen gewaschen: 75/25; 50/50; 25/75; 0/100. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min in 2x SSC mit 1 % SDS bei 70 °C und 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dreimaligem Waschen in MabS/0,1 % Tween für 10 min bei Raumtemperatur, wurden die Proben für 1 h mit dem Blockierungsreagenz blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-AP-gekoppelten Antikörper bei 4°C unter Schütteln über Nacht. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Proben für 10 min in der Blockierungslösung und anschließend in 50 % Blockierungslösung in MabS/0,1 % Tween. Danach wurden die Schnitte 1x10 min, 3x30 min und 1x60 min in MabS/0,1 % Tween gespült. Anschließend wurden die Proben 3x10 min in Reaktionspuffer mit 0,1 % Tween und 1x30 min in Reaktionspuffer mit 0,1 % Tween und einer Spatelspitze Levamisol gewaschen. Der Reaktionspuffer wurde durch Reaktionspuffer mit NTP/BCIP ersetzt. Dabei wurde zu 35 ml Reaktionspuffer 131,25 µl BCIP und 175 µl NBT gegeben. Die Färbereaktion wurde bei RT über mehrere Stunden oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Zum Stoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte 3x10 min in PBS/0,1% Tween gewaschen und anschließend in Mowiol/n-Propyl-Gallat eingedeckelt.

3.8.4. *In situ*-Hybridisierung an Kryostatschnitten

Es wurde unter Ribonuklease-freien Bedingungen, entsprechend Abschnitt 3.8.2 gearbeitet. Unfixierte Embryonen des Embryonaltages 14, die in kaltem Isopropanol (-40 °C) eingefroren und bei -80 °C

gelagert wurden, wurden im Kryostaten bei einer Temperatur von $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ coronal geschnitten, auf Super Frost plus Objektträger aufgezogen und für 3 h bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einer Heizplatte getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4% PFA (pH=7,4 bis 7,6) für 10 min, 5 min waschen in PBS und die Destabilisierung der Membran mit 0,2 M HCl für 10 min. Nach dem Spülen der Schnitte in PBS für 5 min erfolgte die Behandlung mit 0,1 M Triethanolamin /HCl (pH=8) und 5 mM Acetanhydrid, um die Aminogruppen zu acetylieren. Während des Waschens in PBS für mindestens 5 min wurde die Hybridisierungslösung mit der Lhx6-Sonde angesetzt, die freundlicherweise von Ronny Niehage zur Verfügung gestellt wurde. Eine feuchte Kammer wurde mit Whatman-Papier ausgelegt und mit 50 ml 5x SSC und 50 % Formamid befeuchtet. Die Objektträger mit den Proben wurden in eine feuchte Kammer auf Metalleinsätze gelegt, mit je 145 μl Hybridisierungslösung benetzt und mit silanisierten Deckgläsern luftblasenfrei überschichtet. Das Silanisieren der Deckgläser erfolgte für 5 s in Repisilan (2 % Dimethyldichlorsilan in 1,1,1,-Trichlorethan), die anschließend je einmal für 5 s in Aceton und absolutem Ethanol gespült und dann zum Trocknen aufgestellt wurden. Die Hybridisierung der Schnitte erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Am nächsten Tag wurden die Schnitte kurz mit 5x SSC abgespült und anschließend 30 min in 50 % Formamid, 2x SSC bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dann erfolgte das Waschen in 0,2x SSC für 60 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und danach für 15 min bei Raumtemperatur. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden 5 min in MaBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 2 % Blockierungsreagenz in MaBS für 60 min behandelt. Anschließend wurden 145 μl eines anti-Dig-Fab Antikörpers gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, 1 zu 750 verdünnt in Blockierungsreagenz pro Objektträger zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3x10 min in MaBS gewaschen und für 5 min in Reaktionspuffer mit einer Spatelspitze Levamisol/Tetramisol inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit je 1 ml Substratlösung (37,5 μl BCIP und 50 μl NBT auf 10 ml Reaktionspuffer) überschichtet und in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit PBS gestoppt und die Präparate in Mowiol/n-Propyl-Gallat eingedeckelt.

3.9. Mikroskopie

Für mikroskopische Aufnahmen wurde ein inverses ZEISS, Axiovert S 100-Mikroskop in Kombination mit einer Spot-Farbkamera und dazugehöriger Software verwendet. Zusätzlich wurden Aufnahmen an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 519) von Zeiss, mit einem 10x Objektiv, mit einer numerischen Apertur (NA) = 0,45 und einem 40x Öl-Objektiv (NA = 1,3) gemacht. Dabei wurde das Pinhole so eingestellt, dass die Dicke des optischen Schnittes 1 μm betrug. Für Aufnahmen von EGFP-Zellen, Alexa 488- und Cy2-markierten Zellen wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und ein Bandpass von 500-550 nm als Emissionsfilter angewendet. Aufnahmen von Cy3-markierten Präparaten wurden unter Verwendung eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von 543 nm und eines Langpasses 560 nm als Emissionsfilter durchgeführt.

3.9.1. „time-lapse“ – Videomikroskopie kortikaler Neurone

Das Wachstum kortikaler Neurone auf homogenen Substraten, im Streifen-Assay und in Co-Kultur mit Fibroblasten wurde mittels „time-lapse“-Videomikroskopie beobachtet. Dabei wurden Mikrofotografien mit einer CCD-Videokamera von wachsenden Zellen in einem Inkubationssystem an einem inversen ZEISS, Axiovert S 100-Mikroskop aufgenommen, die dann zu einem Videofilm zusammengefügt wurden. Das Computerprogramm METAMORPH (MetaMorph Imaging System, Version 4.0; UNIVERSAL IMAGING CORPORATION) und die Steuereinheit (Multi Control 2000) ermöglichte dabei die die Ansteuerung sowie Fokusregulierung von bis zu 8 Positionen während eines „time-lapse“-Experiments. Das Inkubationssystem gewährte mit 37 °C und 5 % CO₂ gute Kulturbedingungen. Das Mikroskop mit Inkubationssystem befand sich auf einem mit Druckluft betriebenen, schwingungsgedämpften Tisch. Die Deckgläser mit Neuronen wurden nach 2 h *in vitro* in eine Petriperm-Petrischale überführt, die sich durch einen gasdurchlässigen Membranboden auszeichnete. Zum Schutz vor Verdunstung wurden 5 ml Zellkulturmedium mit 6 ml hoch viskosem Mineralöl (d = 0,84 g/ml) überschichtet. Die Bilder wurden im Phasenkontrast mit 10-facher Vergrößerung (ZEISS LD Acroplan, numerische Apertur: 0,60 Korr Ph1) alle 6 min aufgenommen.

3.9.2. „time-lapse“ – Videomikroskopie migrierender Zellen in coronalen Schnitten

Die Gehirnschnitte wurden in Petriperm-Kulturschalen mit 2 ml Kulturmedium und 6 ml Mineralöl und in die Inkubationseinheit mit 37 °C und 5 % CO₂ am LSM 510 von Zeiss überführt. Es wurde ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und als Emissionsfilter ein Bandpass 500-550 nm verwendet. Mit einem 10x Objektiv (NA=0,45) wurde alle 10 min ein Scan durchgeführt. Mit Hilfe der LSM-Software von Zeiss wurden die Projektionen der einzelnen Scans zusammengefügt und als Filme exportiert. Um die Lokalisation der migrierenden EGFP-Neurone im Schnitt zu bestimmen, wurden jeweils Durchlichtaufnahmen mit differentiellm Interferenzkontrast (DIC) gemacht, die den „time-lapse“ Filmen mit der *Sony Foundry Vegas 4.0* Software unterlegt wurden.

3.10. Analyse

3.10.1. Statistik

Für die statistischen Analysen wurde der *student t-test* für unabhängige Stichproben bzw. für abhängige Stichproben mit der *Microcal Origin 6.0G Software* durchgeführt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte (MW) ± SEM. Das statistische Signifikanzniveau wurde für die Irrtumswahrscheinlichkeit auf $p \leq 0,01$ festgesetzt.

3.10.2. Quantifizierung der Aggregation kortikaler Neurone

Als Aggregat wurde die Adhäsion der Somata von mindestens zwei Neuronen gewertet. Es wurde die Gesamtzellzahl, die Anzahl der aggregierten Zellen und die Anzahl der Neurone pro Aggregat der einzelnen Präparate ermittelt und normiert. Die normierten Werte wurden statistisch verglichen.

3.10.3. Quantifizierung der Fluoreszenzsignale der immunhistochemischen Markierungen auf dem EphrinA5-Fc Substrat

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale auf dem EphrinA5-Fc Substrat, wurden Fluoreszenzbilder von den Präparaten mit konstanter Belichtungszeit im schwarz-weiß Modus und alternierend dazu Phasenkontrastaufnahmen am inversen ZEISS Axiovert S 100-Mikroskop gemacht. Die Größe und Fluoreszenzintensitäten der immunhistochemischen Markierungen des PY99- bzw. EphA4-Antikörpers und die Größe der Zellaggregate wurden unter Verwendung der *ImageJ Software* ermittelt. Da sich die Größe der Zell-Aggregate unter den verschiedenen Bedingungen veränderte, wurden jeweils die Quotienten der Flächen der Immunmarkierungen und die der Zellaggregate gebildet. Der größte Quotient wurde auf 100 % festgesetzt, die anderen Quotienten relativ dazu normiert und statistisch verglichen.

3.10.4. Quantifizierung der Intensitäten der PY99-Banden im Western Blot

Zur Messung der Intensitäten der PY99-Signale im Western-Blot wurden die erhaltenen Banden auf den Röntgenfilmen mit einer Digitalkamera abfotografiert und deren Intensitäten mit *ImageJ* bestimmt. Die ermittelte Intensität der PY99-Bande des EphA-Rezeptors nach PP3-Behandlung (Kontrolle) wurde auf 100 % festgesetzt und die Abnahme der Intensität der Tyrosinphosphorylierung nach PP2-Behandlung relativ dazu ermittelt und statistisch verglichen.

3.10.5. Quantifizierung der Migration von MGE-Neurone auf coronalen Schnitten *in vitro*

Von den Schnitten wurden alternierend Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen mit 100-facher Vergrößerung mit einem inversen ZEISS Axiovert S 100-Mikroskop gemacht. Die Einzelbilder wurden mittels *Photoshop Software* zusammengesetzt. Die Auswertung der Migration von EGFP-MGE auf coronalen Wildtyp-Schnitten *in vitro* erforderte die Normierung aller Schnitte, da sich diese in Größe und Ausdehnung unterschieden. Dazu wurde jeder Schnitt einer Hemisphäre mit der *ImageJ Software* vermessen. Wie in Abb. 3.10.5. dargestellt, wurde die Längsausdehnung jedes Schnittes von Beginn des Kortex auf der ventrikulären Seite bis zum Beginn der AEP (A) bestimmt, was sich in jedem Schnitt deutlich abzeichnete. Bei $\frac{1}{4}$ dieser Längsausdehnung A (A/4) von der lateralen Seite aus, wurde ein Balken über die ganze dorsal-ventral Ausdehnung gelegt. Die Breite dieses Balkens

entsprach jeweils dem zwanzigsten Teil der Längsausdehnung A ($A/20$). Die dorsal-ventral Ausdehnung des Balkens wurde gemessen und in 25 gleich große Regionen unterteilt, für die jeweils die Fluoreszenzintensität mit der Software *ImageJ* bestimmt wurde. Die Fluoreszenzintensitäten wurden als Maß für die Quantität der migrierenden Zellen verwendet. Dabei wurde der höchste gemessene Wert auf 100 % festgesetzt. Die erhaltenen Mittelwerte der einzelnen Regionen bei den verschiedenen Versuchsbedingungen wurden statistisch miteinander verglichen. Die Zuordnung der Regionen zu anatomischen Zonen wurde mit Hilfe eines embryonalen Maus- und Rattenatlas und Angaben der Literatur bezüglich der Embryonalstage E14 und E16 getroffen („Atlas of the developing rat brain“; „Atlas of mouse development“; (Marin et al., 2001a). Um sicherzustellen auch nur die Ventrikularzone und nicht Teile der oberen Subventrikularzone zu beschreiben, wurde ausschließlich die Region 1 als Ventrikularzone definiert. Die Regionen 2 bis 7 wurden der Subventrikularzone und die Regionen 8 bis 13 der striatalen Anlage zugeordnet.

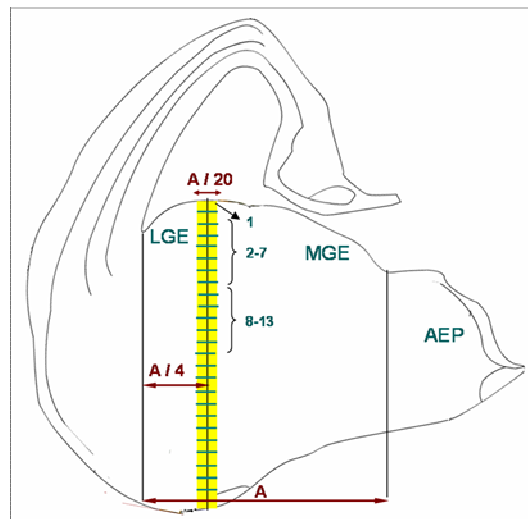


Abb. 3.10.5. : schematische Darstellung der Vermessung der Schnitte für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten. A = gemessener Abstand von Beginn des Kortex (auf Ventrikelseite) bis Beginn der AEP. Bei $A/4$ lag die Mittelachse des ausgemessenen Balkens in der LGE. Die Breite des Balkens ergab sich aus dem zwanzigsten Teil von A ($A/20$). Des Weiteren wurde der ausgemessene Bereich in 25 gleich große Regionen unterteilt, für die jeweils die Fluoreszenzintensitäten bestimmt wurden.

4. Ergebnisse

4.1. Der Einfluß von EphrinA5 auf die Aggregation und Migration kortikaler Neurone *in vitro*

4.1.1. Geclustertes EphrinA5-Fc aktiviert EphA-Rezeptoren dissoziierter kortikaler Neurone *in vitro*

Einleitend wurde die EphA Rezeptorexpression der kortikalen Neuronen *in vitro* immunohistochemisch nachgewiesen. Dazu wurden E14 Kortex-Neurone für 2 Tage auf Laminin/Poly-L-Lysin kultiviert und anschließend mit einem EphA4-Antikörper markiert. Die Neurone zeigten eine deutliche Immunreaktivität für EphA-Rezeptoren über den gesamten Zellen (Abb. 4.1.1. B). Weiterhin wurde überprüft, ob die künstlich erzeugten Cluster von EphrinA5-Fc an EphA-Rezeptoren dissoziierter kortikaler Neurone *in vitro* binden und eine Aktivierung (Phosphorylierung) der Rezeptoren induzieren können. Dazu wurden auf Laminin/Poly-L-Lysin kultivierte Neurone nach 2 Tagen *in vitro* für 30 min mit 8 µg/ml EphrinA5/Fc bei 37 °C behandelt, das mit einem Alexa488-markierten anti-IgG-Antikörper geclustert wurde. Anschließend wurden Phosphotyrosine mit einem anti-PY99-Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Abbildung 4.1.1. D zeigt die Bindungsstellen des Alexa 488-markierten EphrinA5-Fc eines kortikalen Neurons. Abbildung 4.1.1. E zeigt das Ergebnis der Phosphotyrosin-Immunfärbung mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper der gleichen Zelle. Eine Co-Lokalisation beider Signale (Abb. 4.1.1. F, gelbe Markierungen) bei Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Aufnahmen deutet auf aktivierte EphA-Rezeptoren hin, die sowohl am Zellkörper, entlang des Axons und der Dendriten zu erkennen sind. Daraus lässt sich ableiten, dass EphA-Rezeptoren von dissoziierten kortikalen Neuronen durch künstlich erzeugte Cluster von rekombinantem chimären EphrinA5-Fc *in vitro* aktiviert werden können.

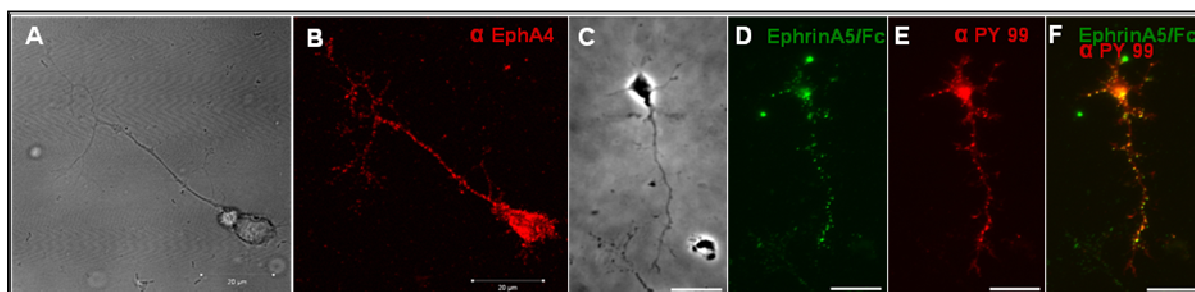


Abb. 4.1.1.: kortikale Neurone auf Laminin / Poly-L-Lysin Substrat nach 2 Tagen *in vitro* exprimieren EphA4 Rezeptoren, die durch geclustertes EphrinA5-Fc aktiviert werden können. (B), Fluoreszenzaufnahme nach einer anti-EphA4 Immunfärbung mit entsprechender Durchlichtaufnahme in (A). (C), Phasenkontrastaufnahme zu (D-F); (D), Fluoreszenzaufnahmen der Alexa488-markierten Bindungsstellen von rekombinantem EphrinA5-Fc; (E), Fluoreszenzaufnahme der immunhistochemischen Markierung phosphorylierter Tyrosine mit einem anti-PY99-Antikörper; (F), Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von EphrinA5-Bindungsstellen (D) und der Phosphotyrosin-Markierung (E). Balken: 20 µm in (A und B); 25 µm in (C-F).

4.1.2. EphrinA5-Fc induziert die Aggregation kortikaler Neurone

Um die funktionellen Effekte der EphrinA5-Fc induzierten EphA-Rezeptoraktivierung von dissoziierten kortikalen Neurone zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst auf homogenem EphrinA5-Fc und als Kontrolle auf homogenem Fc-Substrat kultiviert. Um ein Auswachsen der Neuriten auf diesen Substraten zu ermöglichen, wurden alle Deckgläser zusätzlich mit Laminin/Poly-L-Lysin beschichtet. Ein wichtiges Kriterium zum Überleben der kortikalen Neurone *in vitro* ist die Zelldichte. Um funktionelle Effekte von EphrinA5-Fc auf dissoziierte Neurone untersuchen zu können, sollte die Dichte der Zellen so gewählt werden, dass die Neurone weitestgehend isoliert voneinander auswachsen. Jedoch war eine bestimmte minimale Zellzahl nötig, um ein gutes Auswachsen der Neurone unter Kulturbedingungen zu erlangen. Dieser Kompromiss wurde bei ungefähr 150 Zellen/mm² erzielt. Bei dieser Zellzahl wuchsen auf dem Kontrollsubstrat nach 2 Tagen *in vitro* 48 % der Neurone isoliert aus und 52 % der Zellen waren aggregiert (Abb. 4.1.2. und Abb. 4.1.2.1.). Als Aggregation wurde der Kontakt von mindestens 2 Zellen am Soma der Neurone definiert. Wurden dissoziierte kortikale Neurone hingegen auf homogenem EphrinA5-Fc (Abb. 4.1.2. und Abb. 4.1.2.1.) kultiviert, so aggregierten innerhalb von 2 Tagen *in vitro* 92 % der Neurone und nur 8 % der Zellen wuchsen isoliert aus. Somit stieg die Aggregation auf EphrinA5-Fc im Vergleich zur Kontrolle um 40 % an ($p < 0,0001$, *students t-test*, 3 unterschiedliche Experimente). Zusätzlich zur erhöhten Anzahl aggregierender Neurone war die mittlere Zellzahl pro Aggregat und somit die Aggregatgröße auf homogenem EphrinA5-Fc (4,4 Zellen pro Aggregat) im Vergleich zum Kontrollsubstrat (2,8 Zellen pro Aggregat) signifikant erhöht ($p < 0,0001$, unabhängiger t-Test, Abb. 4.1.2.1. B). Um einen Einblick in den Zeitverlauf der Aggregation zu erhalten, wurden die Neurone auf homogenem EphrinA5-Fc und Kontrollsubstrat zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Bereits nach 10 h *in vitro* konnte ein Anstieg der Anzahl aggregierter Neurone verzeichnet werden (Abb. 4.1.2. und 4.1.2.1. C).

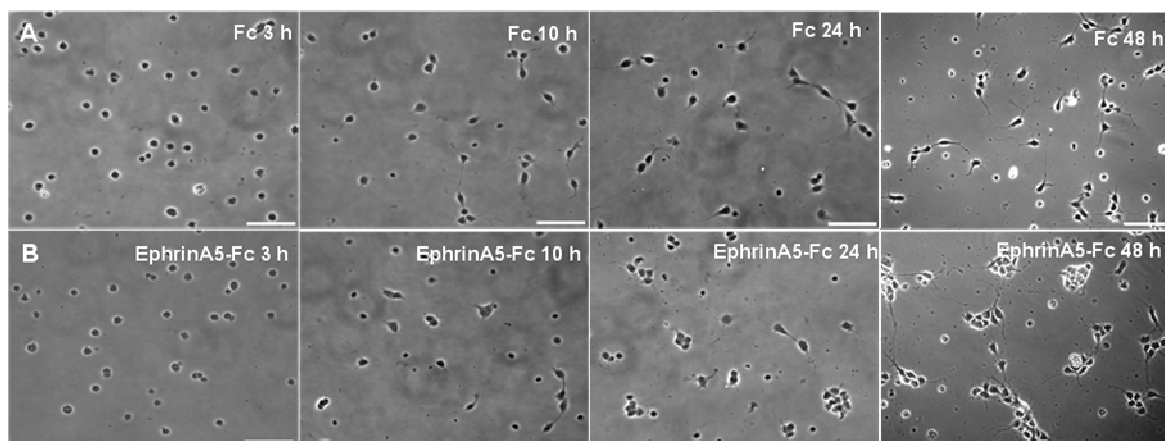


Abb. 4.1.2.: geclustertes rekombinantes EphrinA5-Fc steigert die Motilität und Aggregation kortikaler Neurone *in vitro*. Phasenkontrastaufnahmen von Neuronen, die entweder auf (A) dem Kontroll-Substrat Fc (obere Reihe) oder (B) homogenem EphrinA5-Fc (untere Reihe) kultiviert und nach verschiedenen Zeiten *in vitro* fixiert wurden (3h, 10h, 24h and 48h). Balken: 50 μ m.

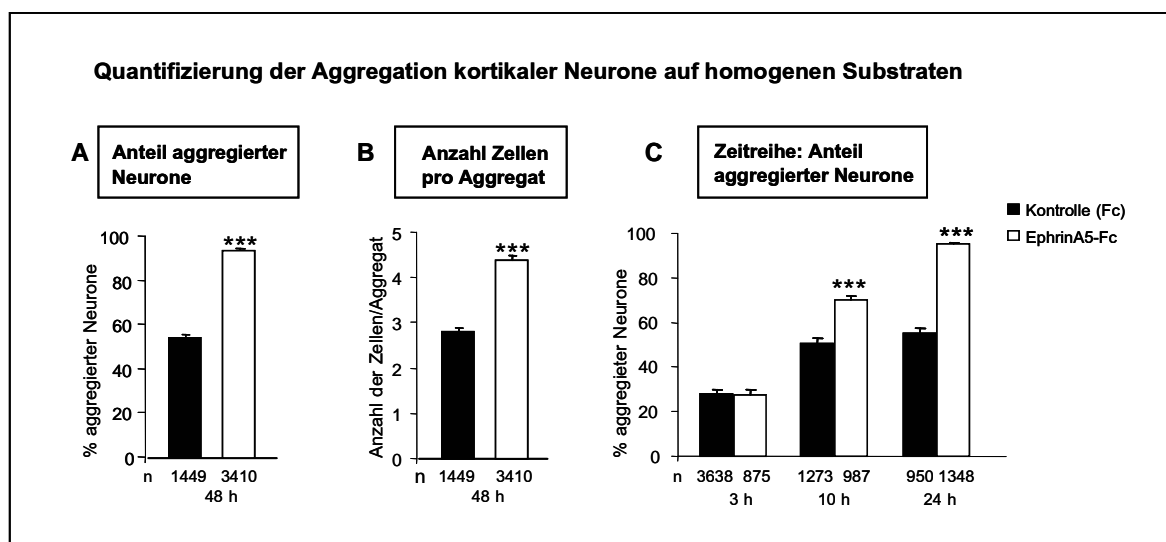


Abb. 4.1.2.1.: Quantifizierung der EphrinA5-Fc induzierten Aggregation. Als Aggregation wurde der Kontakt von mindestens zwei Zellen am Soma der Neurone definiert. (A), Im Vergleich zur Kontrolle stieg die EphrinA5-Fc induzierte Aggregation der Neurone nach 2 Tagen *in vitro* um 38 % an. (B), Quantifizierung der Zellzahl der Aggregate auf homogenem EphrinA5-Fc und Fc. (C), Quantifizierung der Anzahl aggregierender Neurone zu verschiedenen Zeiten (3h, 10h and 24h) *in vitro*. Eine EphrinA5-Fc induzierte Erhöhung der Aggregation konnte bereits nach 10h *in vitro* beobachtet werden; n = Anzahl der Neurone.

Verschiedene Mechanismen, die entweder zusammen oder einzeln wirken, könnten zur gesteigerten Aggregation der Zellen auf homogenem EphrinA5-Fc führen. Die EphA-Rezeptor-Aktivierung könnte zur Veränderung der Zelloberflächenmoleküle führen, die Zell-Substrat und Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Des weiteren könnte EphrinA5-Fc auch die Motilität der Zellen steigern. Ferner kann die EphA-Rezeptor-Aktivierung in einer verstärkten Ausbildung von Neuriten resultieren, was wiederum die Frequenz der Zell-Zell-Kontakte erhöhen und somit eine zu einer gesteigerten Zell-Zell-Kontakt vermittelten Aggregation der Neurone führen könnte. Schließlich kann EphrinA5-Fc auch ein stark repulsives Substrat für die kortikale Neurone darstellen, die Zelloberfläche wäre dann das bevorzugte Substrat für kortikale Neurone, was zur Bildung von Zellaggregaten führen könnte. Um einen besseren Einblick in die Problematik zu gewinnen, wurde die Aggregation der Neurone mit Time-lapse-Videomikroskopie genauer beobachtet. Das Wachstum der Neurone auf EphrinA5-Fc und dem Kontrollsubstrat wurde für jeweils 15 h aufgezeichnet (3 h-18 h *in vitro*). Sequenzen aus den Time-lapse Aufnahmen sind in Abbildung 4.1.2.2 A für EphrinA5-Fc und in Abbildung 4.1.2.2. B für das Kontrollsubstrat dargestellt. Die originalen Filme sind im Zusatzmaterial enthalten (Absatz 8.3: Film 1 und 2 auf CD). Auf homogenem EphrinA5-Fc war zu beobachten, dass die Neurone weit häufiger Fortsätze ausbildeten und diese auch wieder zurückzogen als in den Kontrollversuchen. Dies führte zu vermehrten Zell-Zell-Kontakten mit umliegenden Neuronen, was in einer gesteigerten Aggregation der Neurone auf EphrinA5-Fc resultierte. In Abbildung 4.1.2.2. A sind Beispiele für kontaktabhängige Aggregationen auf dem EphrinA5-Fc Substrat dargestellt und mit Pfeilen markiert. Die Sequenzen der Aufnahmen der Zellen auf dem Kontrollsubstrat (Abb. 4.1.2.2. B) zeigen ein Auswachsen mit weitaus geringerer Motilität und Aggregation. Die Quantifizierung der Time-lapse-Aufnahmen ergab, dass auf dem Kontrollsubstrat nur 12 % der Neurone Kontakte mit

anderen Zellen ausbildeten, auf homogenem EphrinA5-Fc hingegen bildeten während der 15 h Aufnahmezeit 16 % der Neurone Kontakte mit umliegenden Zellen aus (Abb. 4.1.2.3. A). Noch deutlicher war der Unterschied in der Anzahl der kontaktabhängigen Aggregationen. Auf homogenem Kontrollprotein resultierten nur 67 % dieser Kontakte in einer Aggregation der Zellen (Abb. 4.1.2.3. B). Wuchsen die Neurone jedoch auf EphrinA5-Fc, so führten 87 % dieser Zell-Zell-Kontakte zu einer gerichteten Bewegung und Aggregation (Abb. 4.1.2.3. B), was in einem deutlichem Anstieg der aggregierenden Zellen auf EphrinA5-Fc im Vergleich zum Kontrollsubstrat nach 15 h *in vitro* resultierte (Abb. 4.1.2.3. C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass EphrinA5 eine gesteigerte Motilität und Aggregation der kortikalen Neurone *in vitro* induziert.

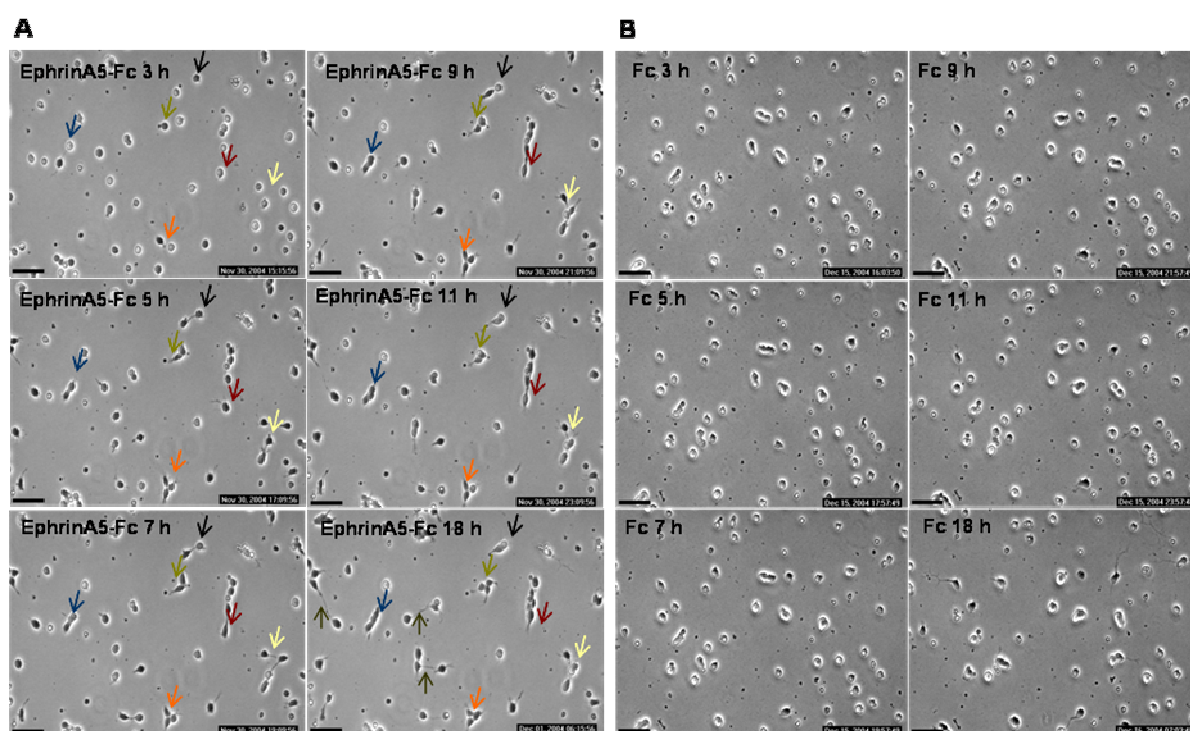


Abb. 4.1.2.2.: Time-Lapse-Videomikroskopie (3-18 h *in vitro*) zeigt, dass EphrinA5-Fc die Motilität und Aggregation kortikaler Neurone *in vitro* erhöht. (A), Sequenzen von Aufnahmen von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc zeigen Beispiele für Zellen, die Kontakte mit umliegenden Neuronen ausbilden, die dann zur Aggregation führen (mit Pfeilen markiert). (B), Sequenzen aus dem Wachstumsverlauf von Neuronen auf homogenem Fc (Kontrollsubstrat) zeigen deutlich weniger kontaktabhängige Aggregation und Motilität. Balken: 50 µm.

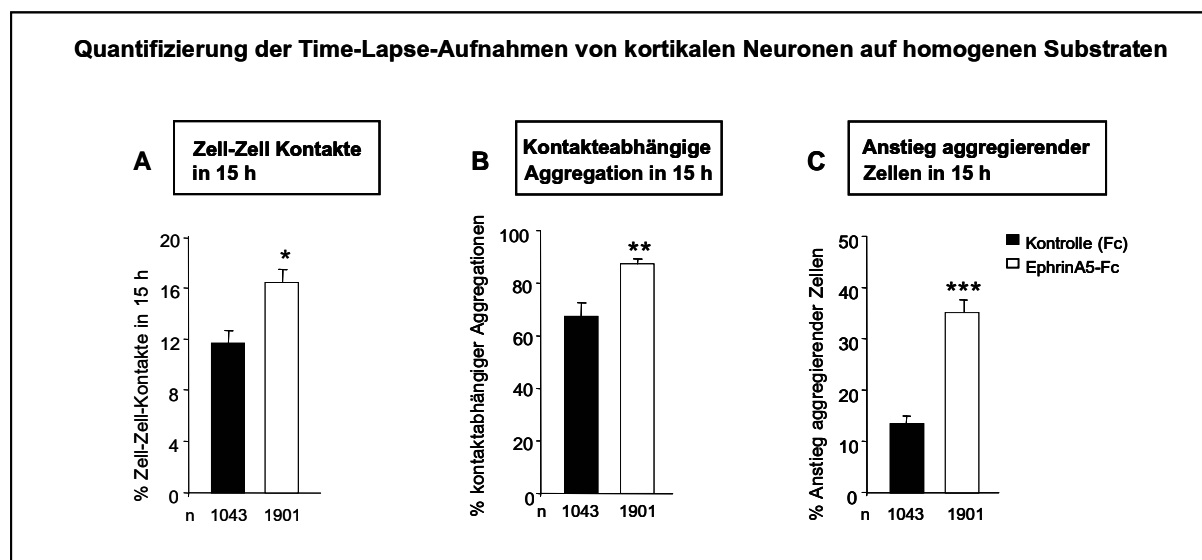


Abb. 4.1.2.3.: Die Quantifizierung der Time-Lapse-Aufnahmen ergeben eine erhöhte Anzahl an Zell-Zell-Kontakten (C), eine gesteigerte kontaktabhängige Aggregation (D) und somit eine stärkere Zunahme der Aggregation (E) auf EphrinA5-Fc im Vergleich zum Kontrollsubstrat; n = Anzahl der Neuronen.

4.1.3. Src-Familie-Kinasen sind involviert im *downstream-signalling* der EphA Rezeptor- vermittelten Zell-Aggregation

Als nächstes sollten mögliche Signal-Moleküle identifiziert werden, die an der EphrinA5-Fc induzierten Aggregation beteiligt sein könnten. In einer Studie von Knöll und Drescher (2004) wurde gezeigt, dass Src-Familie-Tyrosin-Kinasen (SFKs) eine wichtige Rolle im *downstream-signaling* der EphA-vermittelten repulsiven Axonlenkung im retinotektalen System spielen. Im Nervensystem der Nagetiere werden 4 verschiedene SFK (Src, Fyn, Lyn, Yes) exprimiert (Thomas und Brugge; 1997). Es ist weiterhin bekannt, dass SFKs an die juxtamembranale Domäne der EphA-Rezeptoren über zwei hoch-konservierte Tyrosin-Reste binden (Ellis et al., 1996; Zisch et al., 1998) und somit die Funktionen oder Bindungseigenschaften weiterer Signalmoleküle modifizieren können.

Ausgehend von diesen Daten sollte überprüft werden, ob SFKs möglicherweise auch in die EphrinA5-Fc stimulierte Aggregation kortikaler Neurone involviert sind. Dazu wurde zunächst die EphrinA5-Fc induzierte Tyrosin-Phosphorylierung der EphA Rezeptoren in Abhängigkeit von der Aktivität der SFKs untersucht. Um die Aktivität der SFKs zu blockieren, wurde ein pharmakologischer Ansatz gewählt. Die chemische Substanz 4-Amino-5-(4-Chlorophenyl)-7-(t-Butyl)pyrazolo [3,4-d] Pyrimidin (PP2) wird weitläufig zur Inaktivierung der SFKs eingesetzt (Hanke et al., 1996; Vindis et al., 2003; Knöll and Drescher, 2004). Als Kontrolle diente 4-Amino-7-Phenylpyrazolo [3,4-d] Pyrimidin (PP3), eine chemisch ähnliche aber funktionell inaktive Substanz. Ausgehend von Literaturangaben wurden kortikale Neurone mit jeweils 10 μ M PP2 bzw. 10 μ M PP3 präinkubiert (Knöll und Drescher et al., 2004) und anschließend mit EphrinA5-Fc oder Fc als Kontrolle präzipitiert. Immunoblots der Präzipitate, bei denen Antikörper gegen EphA5 und Phosphotyrosin (Klon 4G10) verwendet wurden,

zeigten eine deutliche Abnahme der EphrinA5-Fc induzierten Tyrosin-Phosphorylierung der EphA-Rezeptoren nach PP2-Behandlung (Abb. 4.1.3. A, 2,6 fache Abnahme, 2 unabhängige Experimente). Daraus lässt sich ableiten, dass SFKs in die Tyrosin-Phosphorylierung der EphA-Rezeptoren nach Rezeptoraktivierung involviert sind.

Um mögliche funktionelle Effekte der SFK-Inhibition nach EphrinA5-Fc stimulierter EphA Rezeptoraktivierung zu untersuchen, wurden kortikale Neurone auf homogenem EphrinA5-Fc mit PP2 und als Kontrolle mit PP3 gelöst im Medium kultiviert. Da SFKs in verschiedenen Signaltransduktionswegen bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind (Morse et al.1998; Takasu et al., 2002; Beggs et al., 1994; Ignelzi et al., 1994; Suetsugu et al., 2002), mußte eine PP2 Konzentration ermittelt werden, die ein gutes Auswachsen dissoziierter Neurone auf dem Kontrollsubstrat weitestgehend erlaubt. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe angefertigt, bei der Neurone auf dem Kontrollsubstrat mit 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M und 10 μ M PP2 behandelt wurden. Ausgehend von Literaturangaben (Knöll und Drescher, 2004) und den Ergebnissen der Konzentrationsreihe wurde für die nachfolgenden Untersuchungen eine PP2-Konzentration von 5 μ M verwendet. Höhere Konzentrationen von PP2 resultierten in einem stark vermindertem Auswachsen der Neuriten, einer verstärkten Aggregation und einem gesteigerten Zelltod der Neurone auf dem Kontroll-Substrat. Bei Zugabe von 5 μ M PP2 wurde das Auswachsen der Neurone auf dem Kontrollsubstrat nur marginal beeinflusst, was zu einer leichten Erhöhung der Anzahl der aggregierten Zellen (Abb. 4.1.3. B, D) führte. Im Gegensatz dazu wurde die EphrinA5-Fc induzierte Aggregation der kortikalen Neurone nach 2 d *in vitro* durch die Inhibition der SFKs signifikant verringert (Abb. 4.1.3. B, C, E). Sowohl die Anzahl aggregierter Zellen (Abb. 4.1.3. C) als auch die Anzahl der Zellen pro Aggregat (Abb. 4.1.3. E) waren auf homogenem EphrinA5-Fc nach PP2-Zugabe signifikant reduziert.

Eine Reduzierung der EphrinA5-induzierten Aggregation nach Blockierung der SFKs konnte auch mit Time-lapse Aufnahmen beobachtet werden. Neurone, deren Migration für 15 h (3-18 h) *in vitro* auf homogenem EphrinA5-Fc aufgezeichnet wurde, zeigten nach Zugabe von 5 μ M PP2 eine deutlich geringere Aggregation im Vergleich zu Neuronen mit normaler SFK-Aktivität (Abb. 4.1.3.1 A und B). Abb. 4.1.3.1. A zeigt jeweils die erste (3 h *in vitro*; obere Reihe) und die letzte Aufnahme (18 h *in vitro*; untere Reihe) der Time-Lapse Sequenzen von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc mit blockierter (PP2 im Medium, linke Spalte) und normaler SFK-Funktion (rechte Spalte). Die Originalaufnahmen sind im Zusatzmaterial enthalten (Abschnitt 8.3.: Film 1 und 3 auf CD). Die Quantifizierung der Time-lapse Aufnahmen ergab, dass nach PP2-Zugabe nur noch 18 % der Neurone auf EphrinA5 aggregierten, was im Vergleich zur Aggregation der Neurone mit normaler SFK Aktivität auf homogenem EphrinA5 (35 %) eine Verringerung um 17 % bedeutet (Abb. 4.1.3.1. B). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass SFKs im EphA-*downstream signaling* der EphrinA5-induzierten Zellaggregation involviert sind.

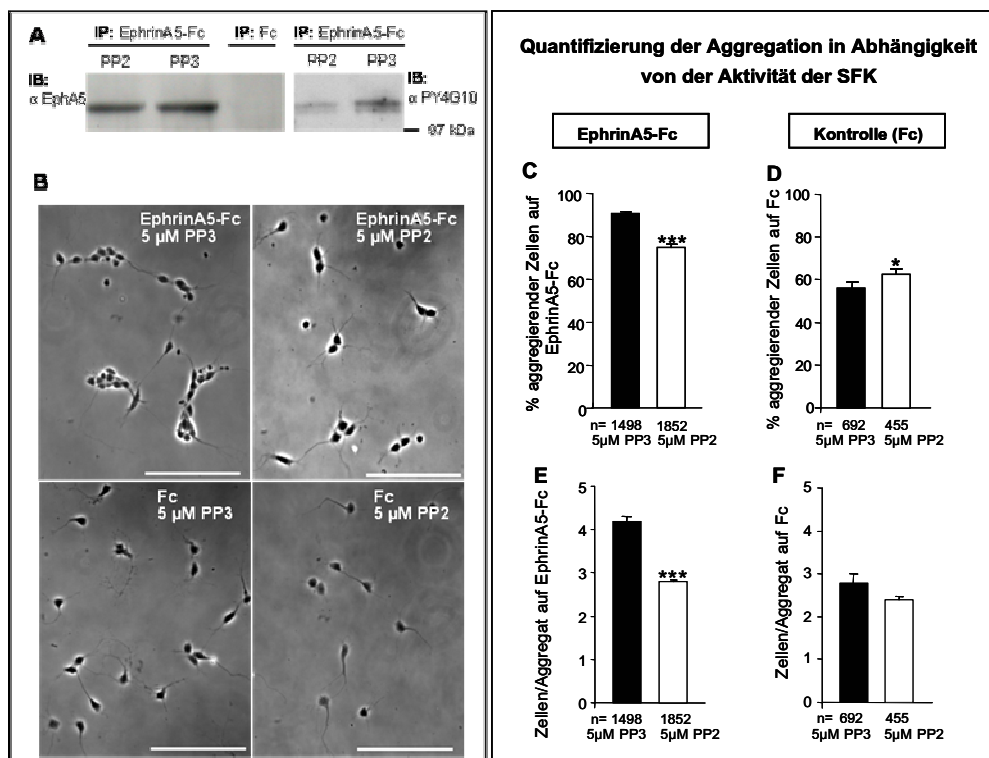


Abb. 4.1.3.: Die EphrinA5-Fc induzierte Aggregation kortikaler Neurone *in vitro* ist abhängig von der Aktivität der SFKs. (A), Nach der Präzipitation kortikalen Gewebes mit EphrinA5-Fc und Fc als Kontrolle, präinkubiert mit 10 μ M PP2 oder 10 μ M PP3, wurden Immunoblots durchgeführt, bei denen anti-EphA5 und anti-PY4G10 Antikörper eingesetzt wurden. Nach PP2-Zugabe war eine deutliche Abnahme der EphrinA5-Fc induzierten Tyrosin-Phosphorylierung der EphA-Rezeptoren zu verzeichnen. (B), Phasenkontrastaufnahmen von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc (obere Reihe) und Kontroll-Substrat (untere Reihe) mit 5 μ M PP3 (linke Spalte) und 5 μ M PP2 (rechte Spalte) im Medium nach 2 d *in vitro*. Die Aggregation der Zellen auf homogenem EphrinA5-Fc wurde nach Inhibierung der SFKs reduziert. Sowohl die Anzahl der aggregierenden Zellen (C) als auch die Zellzahl pro Aggregat (D) wurde nach PP2-Zugabe verringert. Auf dem Kontrollsubstrat war eine leichte Erhöhung der Aggregation durch die Blockierung der SFKs zu erkennen (D). Als Kontrollsubstanz diente PP3, die das Wachstum der Neurone weder auf dem Kontrollsubstrat noch auf homogenem EphrinA5-Fc beeinflusste. Balken: 100 μ m; n = Anzahl der Neurone.

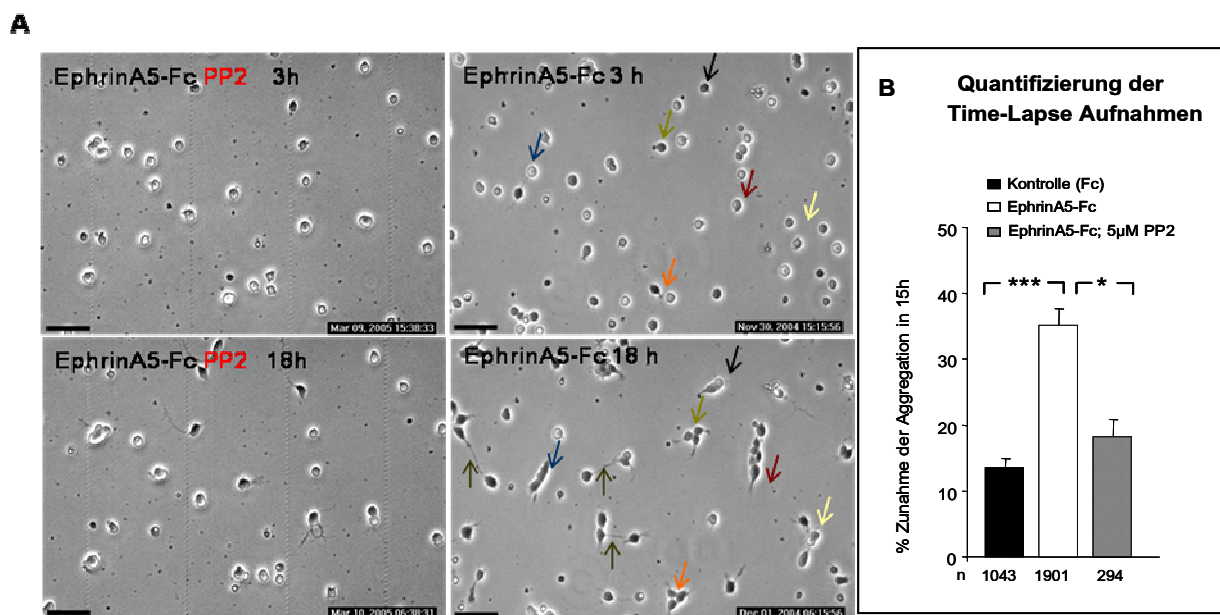


Abb. 4.1.3.1.: Time-lapse Aufnahmen von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc mit PP2 im Medium für 15 h (3-18 h) *in vitro* zeigen eine verringerte EphrinA5 induzierte Aggregation. (A); Phasenkontrastaufnahmen aus den Time-lapse Sequenzen von Neuronen auf homogenem EphrinA5 mit durch PP2 inhibierter (linke Spalte) und normaler SFK Aktivität (rechte Spalte). Um

den Einfluss der SFK auf die EphrinA5-induzierte Aggregation zu verdeutlichen, wurde jeweils die erste (nach 3 h *in vitro*; obere Reihe) und die letzte Time-Lapse Aufnahme (nach 18 h *in vitro*; untere Reihe) abgebildet. (B); Die Quantifizierung der Aggregation die in 15 h (3-18 h) *in vitro* aufgezeichnet wurde, ergab eine 17 % ige Reduzierung der Aggregation nach SFK Inhibition. Balken: 50 μ m; n = Anzahl der Neurone.

4.1.4. SFK-Inhibition bewirkt eine Konversion des repulsiven Effektes von EphrinA5 in Attraktion

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde gezeigt, dass EphrinA5-Fc die Aggregation kortikaler Neurone SFK-abhängig erhöht. Time-lapse-Aufnahmen deuteten weiterhin darauf hin, dass die Aggregation durch eine EphA-vermittelte gesteigerte Motilität der Zellen zustande kommt. Die gesteigerte Motilität könnte eine Folge von repulsiven Interaktionen sein, wie sie für das Eph-Rezeptor *signaling* häufig beschrieben worden sind (Vanderhaeghen et al. 1998; Wilkinson et al., 2001; Drescher et al., 2002). Um zu untersuchen, ob EphrinA5-Fc eine repulsive Wirkung auf kortikale Neurone hat, wurde der von Vielmetter et al. (1990) entwickelte Streifenassay angewendet. Mit Hilfe einer Silikonmatrize wurden alternierende 50 μ m breite Streifen aus EphrinA5-Fc, geclustert mit einem Fluoreszenz-markierten anti-Fc Antikörper, und aus unmarkiertem geclusterten Kontrollprotein (Fc) hergestellt. Die Neurone wurden gleichmäßig auf dem Streifenfeld verteilt und für 2 Tage kultiviert. Hatten die Zellen die Wahl zwischen dem EphrinA5-Fc und dem Kontrollsubstrat, so vermieden 80% der Neurone die EphrinA5-Fc-Streifen und wuchsen nach 2 d *in vitro* bevorzugt auf den Kontroll-Streifen (Abb. 4.1.4. B und Abb. 4.1.4.1. A). Dieser Effekt war abhängig von der Konzentration von EphrinA5-Fc. Ein bevorzugtes Auswachsen der Zellen auf den Kontroll-Streifen konnte bis zu einer EphrinA5-Fc Konzentration von 0,08 μ g/ml beobachtet werden. Geringere EphrinA5-Fc Konzentrationen ergaben kein präferentielles Wachstum mehr (Abb. 4.1.4.1. A). Alternierende Streifen aus markiertem und unmarkiertem Kontroll-Protein resultierten in einer Gleichverteilung der Zellen (Abb. 4.1.4. A und 4.1.4.1. A).

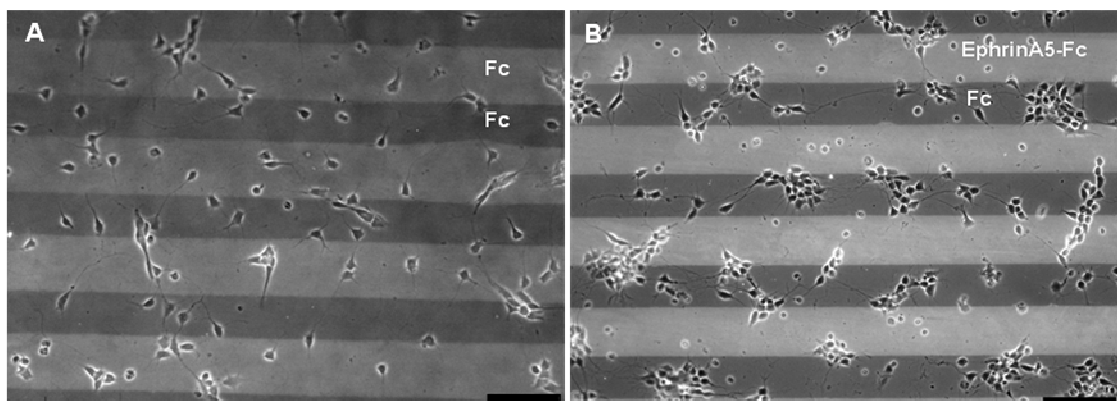


Abb. 4.1.4.: EphrinA5-Fc hat einen repulsiven Effekt auf dissoziierte kortikale Neurone im Streifenassay nach 2 Tagen *in vitro*. (A), Neurone auf alternierenden Streifen aus Alexa488-markierten und unmarkiertem Kontrollprotein (3 μ g/ml) zeigen kein präferentielles Wachstum. (B), Wachsen die Neurone auf alternierenden Streifen aus Alexa488-markiertem EphrinA5-Fc

(8 µg/ml) und unmarkiertem Kontrollprotein (3 µg/ml), so zeigen die Neurone eine deutliche Präferenz für die Kontroll-Streifen und vermeiden die EphrinA5-Fc-Streifen nach 2 Tagen *in vitro*. Balken: 50 µm.

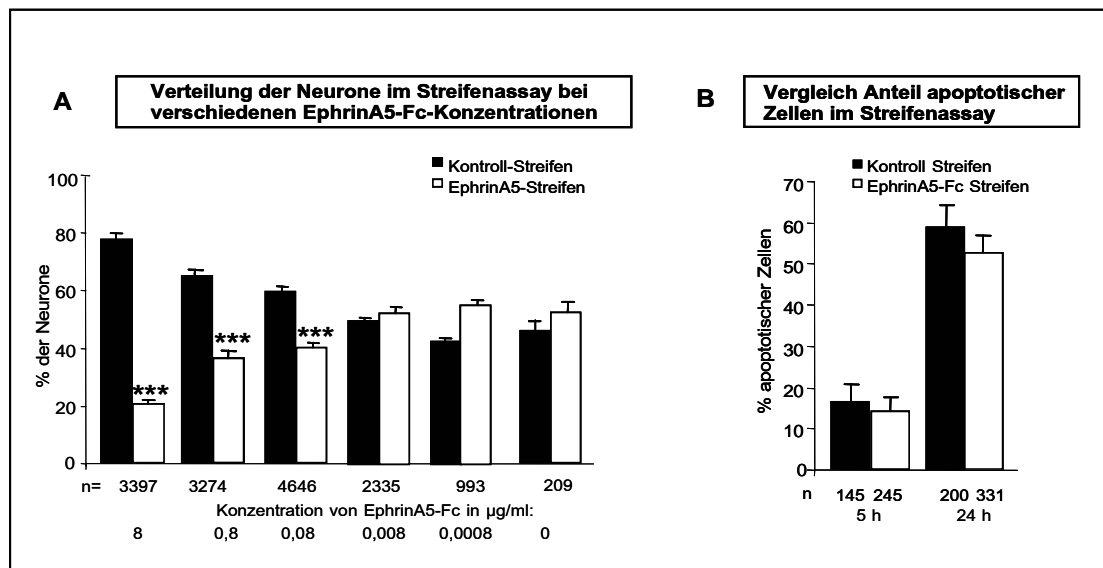


Abb. 4.1.4.1.: (A), Quantifizierung der Verteilung der Neurone im Streifenassay in Abhängigkeit von verschiedenen EphrinA5-Fc Konzentrationen. Der repulsive Effekt von EphrinA5-Fc ist konzentrationsabhängig und kann bis zu einer Konzentration von 0,08 µg/ml EphrinA5-Fc im Streifenassay nachgewiesen werden. (B), Quantifizierung der Anzahl apoptotischer Zellen auf EphrinA5-Fc und Kontroll-Streifen nach jeweils 5 h und 24 h *in vitro* mittels Tunel-Assay; n = Anzahl der Neurone.

Eine mögliche Erklärung für die ungleiche Verteilung der Neuronen im Streifenassay könnte ein durch EphrinA5 induzierter Zelltod sein. Vanderheaghen et al., 2005 haben eine durch EphrinA-EphA Interaktionen vermittelte regulierte Apoptose kortikaler Vorläuferzellen beschrieben. Um eine mögliche Erhöhung der Apoptose kortikaler Neurone auf den EphrinA5-Fc Streifen gegenüber Neuronen auf den Kontroll-Streifen festzustellen, wurde ein Apoptose-Kit (TUNEL-Assay) eingesetzt, der fragmentierte DNA als Charakteristikum apoptotischer Zellen markiert. Eine Quantifizierung nach 5 h und nach 24 h *in vitro* ergab jedoch keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen auf den EphrinA5-Fc-Streifen im Vergleich zu Neuronen auf den Kontroll-Streifen (Abb. 4.1.4.1. B). Diese Daten konnten durch Time-Lapse Aufnahmen gestützt werden, die ebenfalls kein vermehrtes Absterben der Neurone auf den EphrinA5-Fc Streifen zeigen. Dagegen konnte man in den Time-Lapse Aufnahmen auf den EphrinA5-Fc Streifen eine gesteigerte Aggregation im Vergleich zu den Zellen auf den Kontrollstreifen erkennen (Abb. 4.1.4.2. A, Abb. 4.1.4.3. A, Zusatzmaterial in Abschnitt 8.3.: Film 4 auf CD). Von allen beobachteten Aggregationen der Neurone finden 83 % der Ereignisse auf den EphrinA5-Fc Streifen statt, nur 17 % der Aggregationen werden durch Zellen vermittelt, die auf den Kontroll-Streifen wachsen (Abb. 4.1.4.3. A). In Abbildung 4.1.4.2. A ist ein Auszug einer Time-Lapse-Sequenz dargestellt, die Aggregationen von Zellen auf dem EphrinA5-Fc Streifen zeigen. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten der homogenen Substrate (Abschnitt 4.1.2.). Zusätzlich konnten Aggregationen zwischen Zellen beobachtet werden, die auf benachbarten Streifen lokalisiert waren. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 4.1.4.2. B dargestellt. 89 % dieser

Kontakte zwischen Zellen benachbarter Streifen resultierten in einer Translokation der Zellen aus den EphrinA5-Fc Streifen in die Kontroll-Streifen (Abb. 4.1.4.3. B; linkes Diagramm: Zell-Zell kontaktabhängig). Weiterhin konnten zu einem geringeren Anteil (30 % der gesamten Translokationsereignisse) Zellbewegungen in anliegende Streifen beobachtet werden, die unabhängig von Zell-Zell-Kontakten und Aggregation stattfanden. Diese Zellbewegungen hatten die gleiche Richtungspräferenz wie die Zell-Zell-Kontakte vermittelten Translokationen. 82 % der beobachteten Zellen bewegten sich aus den EphrinA5-Fc in die Kontrollstreifen, nur 18 % wanderten umgekehrt in die EphrinA5-Fc Streifen ein (Abb. 4.1.4.3. B; rechtes Diagramm: ohne Zell-Zell-Kontakt). Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die ungleiche Verteilung der Neurone im Streifenassay durch eine repulsive Wirkung von EphrinA5-Fc auf kortikale Neurone zustande kommt, die zu einer gerichteten Bewegung aus den EphrinA5-Fc-Streifen in die Kontroll-Streifen führt.

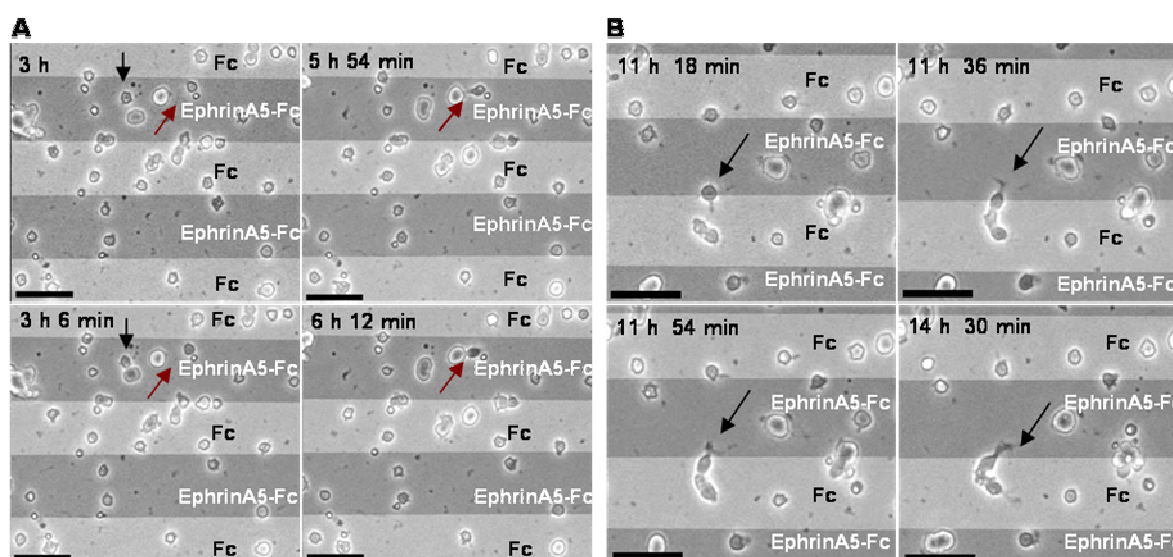


Abb. 4.1.4.2.: Time-Lapse-Aufnahmen kortikaler Neurone im Streifenassay (3-18 h *in vitro*) zeigen eine gesteigerte Aggregation der Zellen auf den EphrinA5-Fc-Streifen verglichen mit der Aggregation auf den Kontroll-Streifen und eine gerichtete Bewegung der Neurone aus den EphrinA5-Fc in die Kontroll-Streifen. (A) und (B) zeigen Ausschnitte aus Time-lapse Sequenzen von Neuronen im Streifenassay, die EphrinA5-Fc enthaltenen Streifen sind dunkel unterlegt. (A), Die Pfeile markieren Beispiele für aggregierende Zellen auf den EphrinA5-Fc-Streifen. (B), Der Pfeil markiert eine auf dem EphrinA5-Fc Streifen liegende Zelle, die mit Neuronen auf dem Kontroll-Streifen aggregiert, was in einer Translokation der Zelle in den Kontroll-Streifen resultiert. Balken: 50 μ m.

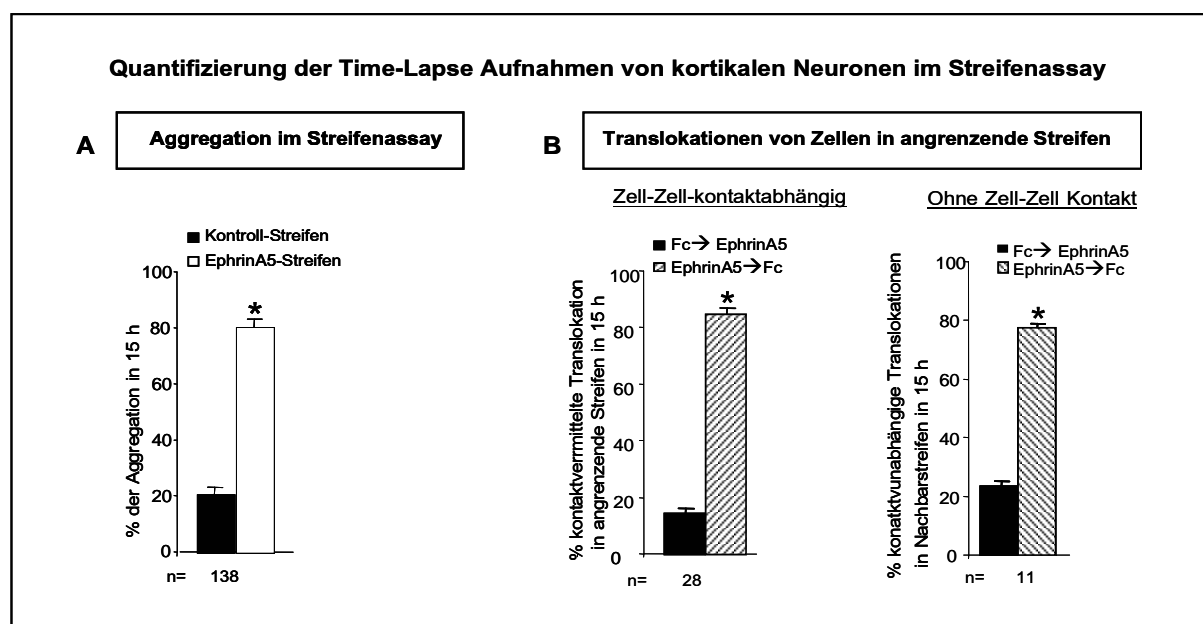


Abb. 4.1.4.3.: (A), Quantifizierung der Time-lapse Aufnahmen hinsichtlich der Aggregation der Zellen auf den EphrinA5-Fc und Kontroll-Streifen. Die Summe aller beobachteten Aggregationen entspricht 100 %. (B), Quantifizierung der Bewegungen von Neuronen in angrenzende Streifen. Der schwarze Balken steht jeweils für die Zellbewegungen aus den Kontroll-Streifen in die EphrinA5-Fc-Streifen. Die gestreiften Balken geben den Anteil der Zellbewegungen aus den EphrinA5-Fc enthaltenen Streifen in die Kontroll-Streifen wieder. Im linken Diagramm sind die Zell-Zell-Kontakt vermittelten Translokationen, im rechten Diagramm die Zell-Zell-kontaktunabhängigen Zellbewegungen in angrenzende Streifen dargestellt. Die Summe aller beobachteten Ereignisse wurde jeweils auf 100 % festgesetzt; n = Anzahl der Neurone.

Um zu untersuchen, ob der EphA-vermittelte repulsive Effekt von EphrinA5-Fc im Streifenassay ebenfalls von der Aktivität der SFK abhängig ist, wurde die pharmakologische Blockierung der SFKs mit der Substanz PP2 im Streifenassay angewendet. Analog zu den Experimenten, die in Abschnitt 4.1.3. dargestellt sind, wurden 5 μ M PP2 eingesetzt. In den Kontrolleexperimenten wurde dem Medium 5 μ M PP3 zugegeben. Die SFK Inhibition auf homogenem Substrat führte zu einer Reduzierung der EphrinA5-Fc-induzierten Aggregation kortikaler Neurone. Dementsprechend wurde eine Neutralisierung des repulsiven Effektes von EphrinA5 im Streifenassay erwartet, was in einer weitestgehend gleichmäßigen Verteilung der Zellen auf dem Streifenfeld resultieren könnte. Jedoch führte die SFK-Inhibition nicht zu einer Gleichverteilung, sondern zu einem präferentiellen Wachstum von 80 % der Neurone auf den EphrinA5-Fc-Streifen nach 2 Tagen *in vitro* (Abb. 4.1.4.4. B, C). Mit Time-Lapse Videomikroskopie (3-18 h *in vitro*) konnte nach PP2 Applikation eine verstärkte Bewegung der Zellen in die EphrinA5-Fc Streifen beobachtet werden (Abb. 4.1.4.5. B). Die Translokationen der Zellen in angrenzende Streifen wurden wieder in Zell-Zell-Kontakt abhängige Bewegung (Abb. 4.1.4.5. B; linkes Diagramm) und Zell-Zell-kontaktunabhängige Translokationen (Abb. 4.1.4.5. B; rechtes Diagramm) unterteilt. In beiden Fällen war eine präferentielle Bewegung der Zellen aus den Kontroll-Streifen in die EphrinA5-Fc enthaltenen Streifen zu erkennen. 73 % der Zell-Zell-Kontakt abhängigen Bewegungen und 85 % der Zell-Zell-Kontakt unabhängigen Translokationen resultierten in einer gerichteten Bewegung in die EphrinA5-Fc-Streifen (Abb. 4.1.4.2. B). Zusätzlich ergaben die Time-Lapse Aufnahmen, dass der Anteil der Zell-Zell-Kontakt unabhängigen Translokationen bei Neuronen mit inhibierten SFKs im Vergleich zu Zellen mit normaler SFK-Aktivität von 30 % auf 57 % anstieg (Abb. 4.1.4.6.), was einen verminderten Anteil der

Zell-Zell-Kontakt vermittelten Translokationen in angrenzende Streifen bedeutet. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die EphA-vermittelte Aggregation der Neuronen auf den EphrinA5-Fc-Streifen nach PP-2 Behandlung reduziert war (Abb. 4.1.4.5. A). Bei Zellen mit normaler SFK-Aktivität fanden 83 % aller Aggregationsereignisse in 15 h (3-18 h) *in vitro* auf den EphrinA5-Fc Streifen statt (Abb. 4.1.4.3. A). Dieser Anteil wurde nach PP2 Behandlung auf 57% reduziert (Abb. 4.1.4.5. A).

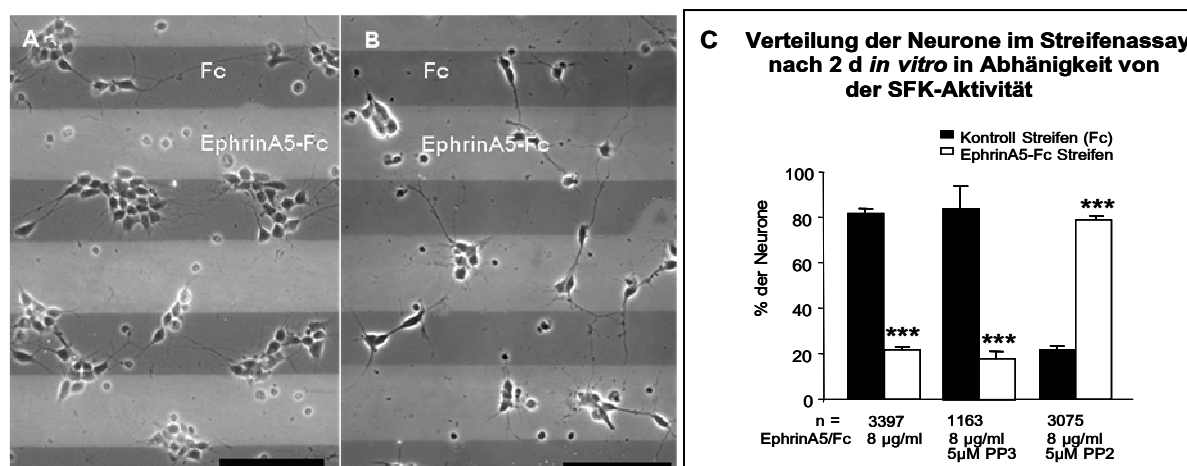


Abb. 4.1.4.4.: Der repulsive Effekt von EphrinA5 auf kortikale Neurone ist von der Aktivität der SFKs abhängig. Eine Inhibition der SFKs resultiert in einer Konversion der Repulsion in Attraktion. Phasenkontrastaufnahmen zeigen Neurone im Streifenassay mit (A) normaler und (B) blockierter SFK-Funktion nach 2 Tagen *in vitro*. (C), Quantifizierung der Verteilung der Neuronen im Streifenassay nach 2 Tagen *in vitro* in Abhängigkeit von der SFK-Aktivität (ohne Zusätze im Medium, mit 5 µM PP2 und 5 µM PP2 als Kontrolle). Balken: 50 µm; n = Anzahl der Neurone.

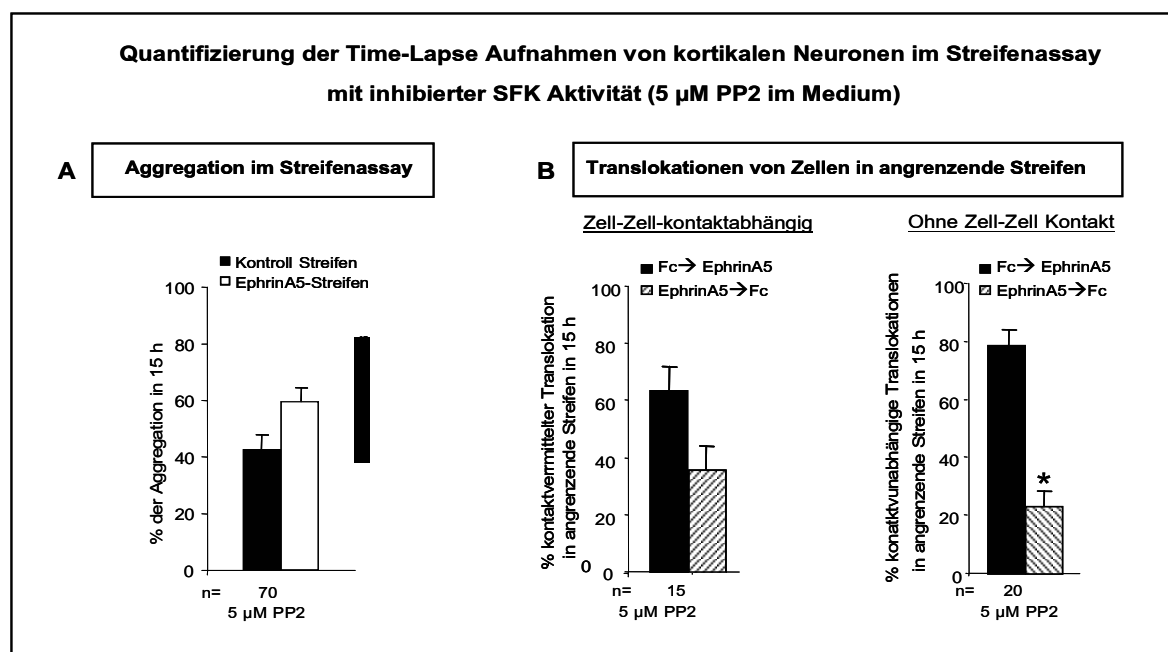


Abb. 4.1.4.5.: Quantifizierung der Time-lapse-Aufnahmen von Neuronen mit inhibierter SFK-Aktivität im Streifenassay. (A), Anteil aggregierender Neurone auf den Kontroll- und EphrinA5-Fc-Streifen. (B), Quantifizierung der Translokationen der Neurone in angrenzende Streifen. Der schwarze Balken steht jeweils für die Zellbewegungen aus den Kontroll-Streifen in die

EphrinA5-Fc-Streifen. Die gestreiften Balken geben den Anteil der Zellbewegungen aus den EphrinA5-Fc enthaltenen Streifen in die Kontroll-Streifen wieder. Im linken Diagramm sind die Zell-Zell-Kontakt vermittelten Translokationen, im rechten Diagramm die Zell-Zell-kontaktunabhängigen Zellbewegungen in angrenzende Streifen dargestellt. Die Summe aller beobachteten Ereignisse wurde jeweils auf 100 % festgesetzt; n = Anzahl der Neurone.

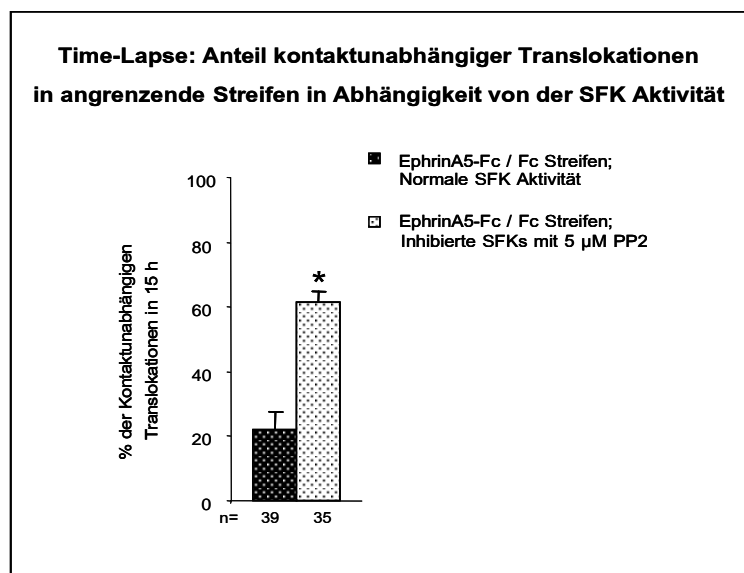


Abb. 4.1.4.6.: Quantifizierung der Time-lapse-Aufnahmen bezüglich der Zell-Zell-kontaktunabhängigen Translokationen von Neuronen in angrenzende Streifen in Abhängigkeit von der SFK-Aktivität; n = Anzahl der Neurone.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SFKs in den EphA vermittelten repulsiven Effekt von EphrinA5-Fc involviert sind. Durch die Inhibition der SFK-Aktivität kann die Repulsion in Attraktion konvertiert werden. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Holmberg et al. (2000), die einen Shift von Repulsion hin zu Adhäsion nach beeinträchtigter Tyrosin-Phosphorylierung von EphA Rezeptoren gezeigt haben. Somit scheint der Charakter zellulärer Wirkungen nach Eph/Ephrin Interaktionen stark abhängig von den verschiedenen *downstream*-Signalmolekülen zu sein.

4.1.5. EphA Rezeptoren werden nach der Bindung an das EphrinA5-Fc Substrat abgegeben

Der beobachtete attraktive Effekt von EphrinA5-Fc auf kortikale Neurone nach Inhibition der SFKs könnte auf die hoch affine Bindung von Ephrin-Liganden und Eph-Rezeptoren zurückzuführen sein. Daraus folgend stellt sich die nahe liegende Frage, wie Zellen mit normaler SFK-Aktivität repulsive Effekte bewerkstelligen, wenn die Bindung von Rezeptoren und Liganden eine adhäsive Interaktion darstellt. Für das EphrinB-System haben Zimmer et al. (2003) eine durch Kontakt induzierte bidirektionale Endozytose des gesamten Rezeptor-Liganden Komplexes während der Zell-Repulsion beschrieben. Für das EphrinA-System konnte ein durch Metalloproteasen vermitteltes Abschneiden (*cleavage*) der extrazellulären Domäne der A-Liganden nach Komplex-Bildung mit deren Rezeptoren

gezeigt werden (Hattori et al., 2000). In den hier beschriebenen *in vitro* Experimenten wuchsen die Neurone jedoch auf EphrinA5-Fc beschichteten Glas-Deckgläsern, die sowohl ein Metalloproteasen vermitteltes *cleavage* der Liganden als auch eine Zell-Zell Kontakt induzierte Endozytose mit Liganden-exprimierenden Zellen ausschließen. Einen ersten Hinweis auf einen weiteren Mechanismus zur Entfernung von Ligand-Rezeptor Komplexen von der Zelloberfläche ergab sich aus Immunfärbungen kortikaler Neurone auf homogenem EphrinA5-Fc nach 2 Tagen *in vitro* mit einem Antikörper gegen den EphA4 Rezeptor. Auf dem EphrinA5-Fc Substrat konnte die EphA4 Immunfärbung nicht nur wie im Kontrollversuch auf den Zellen detektiert werden, sondern auch zusätzlich auf dem Substrat in einem „Hof“ um die Zellen herum als intensives punktförmiges Signal (Abb. 4.1.5. A, A', B, B'). Eine sehr ähnliche Markierung konnte man mit einer Immunfärbung gegen Phosphotyrosine mit einem anti-PY99 Antikörper auf dem EphrinA5-Fc Substrat erkennen (Abb. 4.1.5. D, D'). Im Gegensatz dazu wurden auf dem Kontrollsubstrat nur die Zellkörper und Fortsätze der Neurone mit den anti-EphA4 und anti-PY99 Antikörpern markiert (Abb. 4.1.5. C, C'). Eine Doppelmarkierung von Zellen auf homogenem EphrinA5-Fc (4.1.5.1. A; Durchlichtaufnahme) mit einem anti-EphA4 (Abb. 4.1.5.1. C) und einem anti-PY99 (Abb. 4.15.1. B) Antikörper ergab eine Co-Lokalisation beider Signale um die Neurone auf dem EphrinA5-Fc Substrat (Abb. 4.1.5.1. D). Eine Phalloidin-Gegenfärbung, zur Markierung von filamentösem Aktin, zeigte deutlich, dass das PY-Signal auf dem Substrat auch an Stellen lokalisiert ist, an denen keine Zellfortsätze mehr vorhanden sind (Abb. 4.1.5.1. E-H). Das punktierte Signal auf dem EphrinA5-Fc-Substrat konnte nur nach Permeabilisierung der Membranen detektiert werden, ohne das Detergenz Triton-X-100 wurden nur die Zelloberflächen mit dem anti-PY99 Antikörper markiert (Abb. 4.1.5. E, E'). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass kortikale Neurone Membranpartikel mit phosphorylierten EphA-Rezeptoren auf dem EphrinA5-Fc Substrat zurücklassen („*membrane-ribbing*“). Dieser Abgabemechanismus der EphA-Rezeptoren der kortikalen Neurone könnte eine Voraussetzung für die EphrinA5-Fc-induzierten Effekte wie gesteigerte Motilität, Aggregation und Repulsion darstellen, die eine Loslösung der Zellen vom Substrat erfordern.

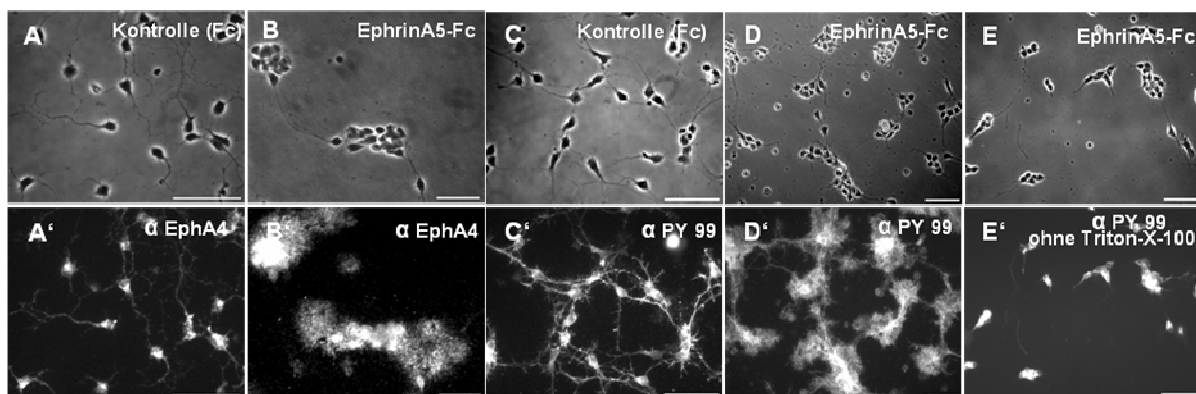


Abb. 4.1.5.: Neurone, die auf homogenem EphrinA5-Fc wachsen, geben aktivierte EphA-Rezeptoren an das Substrat ab. (A'), auf dem Kontroll-Substrat war die EphA4 Immunreaktivität auf die Neuriten und die Zellkörper beschränkt. (B'), auf EphrinA5-Fc resultierte die EphA4 Immunfärbung in einer extensiven Markierung des die Zellen umgebenden Substrates zusätzlich zur Färbung der Zellen. Ein sehr ähnliches Färbemuster der Zellen und des umgebenden Substrates wurde mit dem PY-99 Antikörper erhalten (D'), wobei auch hier auf dem Kontrollsubstrat die PY-99 Markierung auf die Zellen beschränkt blieb (C').

(E'), PY-99 Markierung von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc ohne Verwendung des Detergenz Triton-X-100. Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen sind in (A)-(E) dargestellt. Balken: 50 μ m.

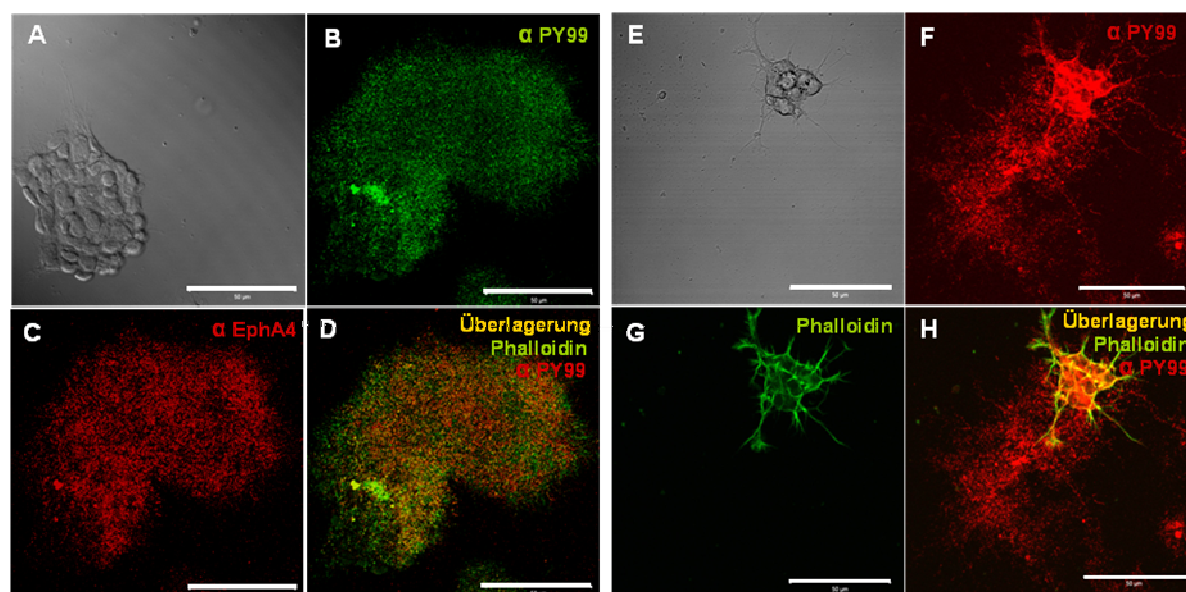


Abb. 4.1.5.1 A-H: Doppelmarkierung von kortikalen Neuronen nach 2 d *in vitro* auf homogenem EphrinA5-Fc unter Verwendung der anti-EphA4 und anti-PY99 Antikörper ergaben eine Co-Lokalisation der Signale auf dem Substrat um die Neurone. Eine Doppelmarkierung mit Phalloidin und dem PY-99 Antikörper konnte deutlich zeigen, dass das PY-99 Signal auf dem Substrat um die Zellen und deren Fortsätze herum lokalisiert war. (A), Durchlichtaufnahme mit differentiellem Interferenzkontrast eines Zellaggregates von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc nach 2 d *in vitro*. (B), anti-Phosphotyrosin –Markierung des Zellaggregates; (C), anti-EphA4-Färbung und (D), Überlagerung beider Immunmarkierungen. (E), Durchlichtaufnahme eines Zellaggregates von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc nach 2 d *in vitro*. (F), anti-Phosphotyrosin –Markierung des Zellaggregates, (G), Phalloidin-Gegenfärbung und (H) Überlagerung beider Markierungen. Balken: 50 μ m.

4.1.6. SFK-Aktivität ist an der Rezeptorabgabe der kortikalen Neurone an das EphrinA5-Fc Substrat beteiligt

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Abgabe der Eph-Rezeptor enthaltenden Membranpartikel nur ein passives Ereignis darstellt oder ob dafür ein Signaltransduktionsweg erforderlich ist. Da die in vorangegangenen Experimenten beschriebenen EphA vermittelten Effekte eine Abhängigkeit von der Aktivität der SFKs zeigten, wurde die EphA Rezeptorabgabe der Neurone nach Inhibition der SFKs mit PP2 untersucht. Wie in Abbildung 4.1.6. dargestellt ist, führte die Zugabe von PP2 zu einer Verkleinerung der Fläche der Immunfärbung von EphA4 auf dem EphrinA5-Fc Substrat um 38 % (Abb. 4.1.6. D) und die Fläche der Immunmarkierung mit dem anti-PY99 Antikörper verringerte sich um 23 % (Abb. 4.1.6. F). Da die PP2-Zugabe in einer Verringerung der Größe der Zellaggregate resultierte, war ein direkter Vergleich der Absolutwerte der Flächen der Immunmarkierungen auf dem EphrinA5-Fc-Substrat nicht aussagekräftig. Deshalb wurde jeweils der Quotient aus der Fläche des Substratsignals der Immunmarkierungen und der Fläche der Zellaggregate berechnet. Der größte Quotient wurde auf 100 % gesetzt, die anderen Quotienten relativ dazu berechnet und mit dem *student t-test* verglichen. Noch auffälliger als die Reduzierung der

relativen Fläche des Substratsignals für PY-99 und EphA4 nach SFK-Inhibition, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Immunmarkierungen. Durch die PP2 Behandlung wurde die Intensität des EphA4 Signals auf dem EphrinA5-Fc Substrates um das 1,3-fache (Abb. 4.1.6. E), die des PY99 Signals um das 1,4 fache reduziert (Abb. 4.1.6. G). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivität der SFKs zumindest zum Teil in die Regulation der Rezeptorabgabe involviert ist.

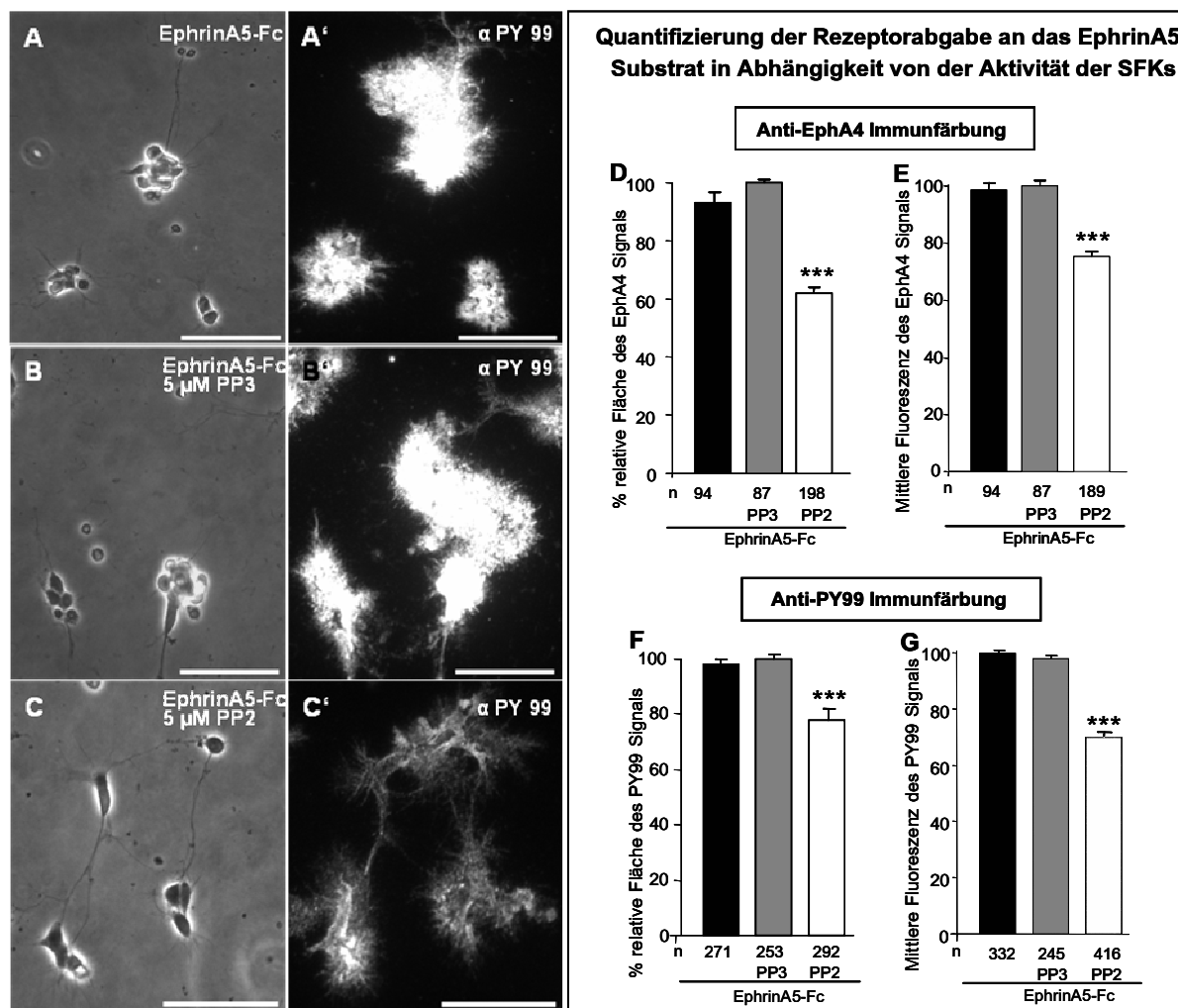


Abb. 4.1.6.: SFK-Aktivität ist in die Regulation der EphA-Rezeptorabgabe kortikaler Neurone involviert. Anti-Phosphotyrosin (PY99) Immunfärbung von Neuronen auf homogenem EphrinA5-Fc nach 2 Tagen *in vitro* mit Kontrollmedium (A'), nach Applikation von (B') 5 μ M PP3 oder (C') 5 μ M PP2. Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen sind in (A)-(C) dargestellt. Die Quantifizierung der Fläche des EphA4 (D) und PY99 (E) Signals relativ zur Größe der Zellaggregate ergab eine Reduzierung nach PP2 Behandlung. Außerdem wurde die Fluoreszenzintensität für die anti-EphA4 (F) und anti-PY99 (G) Immunmarkierung ermittelt, die sich nach PP2-Behandlung ebenfalls verringerte. Balken = 50 μ m; n = Anzahl der Zellaggregate.

4.1.7. Abgabe von EphA-Rezeptoren nach Zell-Zell Kontakt

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Experimente weisen auf einen Abgabemechanismus der EphA-Rezeptoren der kortikalen Neurone an ein zwei-dimensionales EphrinA5-Fc Substrat hin. Um zu überprüfen, ob EphA-Rezeptoren auch nach Zell-Zell-Kontakt an Liganden exprimierende Zellen abgegeben werden können, wurden kortikale Neurone zusammen mit EphrinA5 transfizierten 3T3NIH Fibroblasten co-kultiviert. Als Kontrolle dienten 3T3NIH Fibroblasten, die nur den Vektor ohne das Insert für EphrinA5 enthielten. Die EphrinA5 mRNA-Expression wurde mit RT-PCR überprüft (siehe Material und Methoden). Um die Funktionalität des EphrinA5-Proteins der transfizierten Fibroblasten auf kortikale Neurone nachzuweisen, wurden die Interaktionen der Neurone mit EphrinA5 transfizierten bzw. Kontroll-Fibroblasten in Co-Kulturen mit von Time-lapse Videomikroskopie für 24 h (1 bis 2 Tage *in vitro*) aufgezeichnet. Aufgrund der häufig beschriebenen repulsiven Effekte von EphrinA5 auf neuronale Zellen und der Resultate der bisher dargestellten Experimente mit rekombinantem EphrinA5-Fc, wurden repulsive Interaktionen zwischen Neuronen und den EphrinA5 enthaltenen Fibroblasten erwartet. Es konnte beobachtet werden, dass die auswachsenden Neuriten der Neurone sich bei Kontakt mit EphrinA5 exprimierenden Zellen deutlich öfter und nach weitaus kürzerer Kontakt-Dauer zurückzogen als nach Kontakt mit Kontroll-Fibroblasten (Abb. 4.1.7. A, siehe auch Abschnitt 8.3. Zusatzmaterial: Film 5 und 6 auf CD). In Abb. 4.1.7. B sind Ausschnitte aus Aufnahmen von Co-Kulturen von Neuronen mit EphrinA5-transfizierten Fibroblasten dargestellt. Weiße Pfeile markieren Neuriten, die Kontakte mit Fibroblasten ausbilden, nach kurzer Dauer zurückziehen und wieder neu ausgebildet werden. In Abbildung 4.1.7. C ist ein Beispiel aus einer Zeitrafferaufnahme einer Co-Kultur von Neuronen mit Kontroll-Fibroblasten dargestellt, in der der Kontakt zwischen einem Neuriten mit Fibroblasten über einen Zeitraum von mehr 2 h aufrechterhalten wird. Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktionalität von membrangebundenen EphrinA5 der transfizierten Zellen hin.

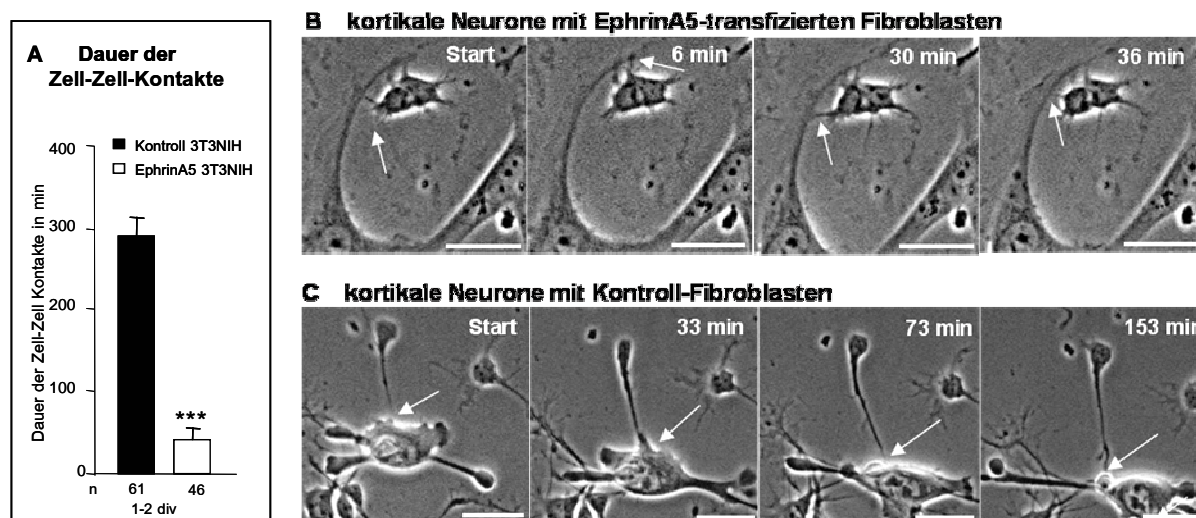


Abb. 4.1.7.: Co-Kulturen von Neuronen mit EphrinA5 transfizierten zeigen repulsive Interaktionen. (A), Quantifizierung der Time-lapse Aufnahmen der Co-Kulturen aus Neuronen mit EphrinA5 transfizierten und Kontroll-Fibroblasten bezüglich der Dauer der Zell-Zell-Kontakte innerhalb von 24 *in vitro*. Ausschnitte aus Aufnahmen von Neuronen mit (C)

EphrinA5-transfizierten Fibroblasten und (D) Kontroll-Fibroblasten. Die Pfeile markieren Neuriten an oder nahe den Kontaktstellen mit Fibroblasten. Balken: 25 μm ; n = Anzahl der Zell-Zell-Kontakte.

Als nächstes sollte eine EphA-Rezeptoraktivierung der Neurone durch EphrinA5-transfizierte Fibroblasten nachgewiesen werden. Dazu wurden Co-Kulturen von Neuronen mit EphrinA5-transfizierten (Abb. 4.7.1.1. B-B''') und Kontroll-Fibroblasten (Abb. 4.7.1.1. A-A''') über 2 Tage *in vitro* angefertigt. Um aktivierte EphA-Rezeptoren nachzuweisen wurde anschließend eine immunhistochemische Doppelmarkierung mit einem anti-EphA4 (4.7.1.1. A'', B'') und einem anti-PY99 Antikörper (4.7.1.1. A', B') durchgeführt. Eine Überlagerung beider Immunmarkierungen lässt eine Co-Lokalisation beider Signale an den Kontaktstellen von Neuronen und EphrinA5-transfizierten Fibroblasten erkennen (Abb. 4.7.1.1. B'''), was auf aktivierte EphA-Rezeptoren hindeutet. An den Kontaktstellen von Neuronen mit Kontroll-Fibroblasten konnten keine überlagerten Signale für EphA4 und PY99 detektiert werden (Abb. 4.7.1.1. A'''). Abbildung 4.7.1.1. B-B''' zeigt deutlich, dass die Signale für PY99 und EphA4 auf der Fibroblastenmembran lokalisiert sind. Da diese starke Markierung bei den Kontroll-Zellen ausbleibt, ist zu vermuten, dass aktivierte EphA-Rezeptoren der Neurone nach Bindung an EphrinA5 der Liganden-exprimierenden Fibroblasten abgegeben werden.

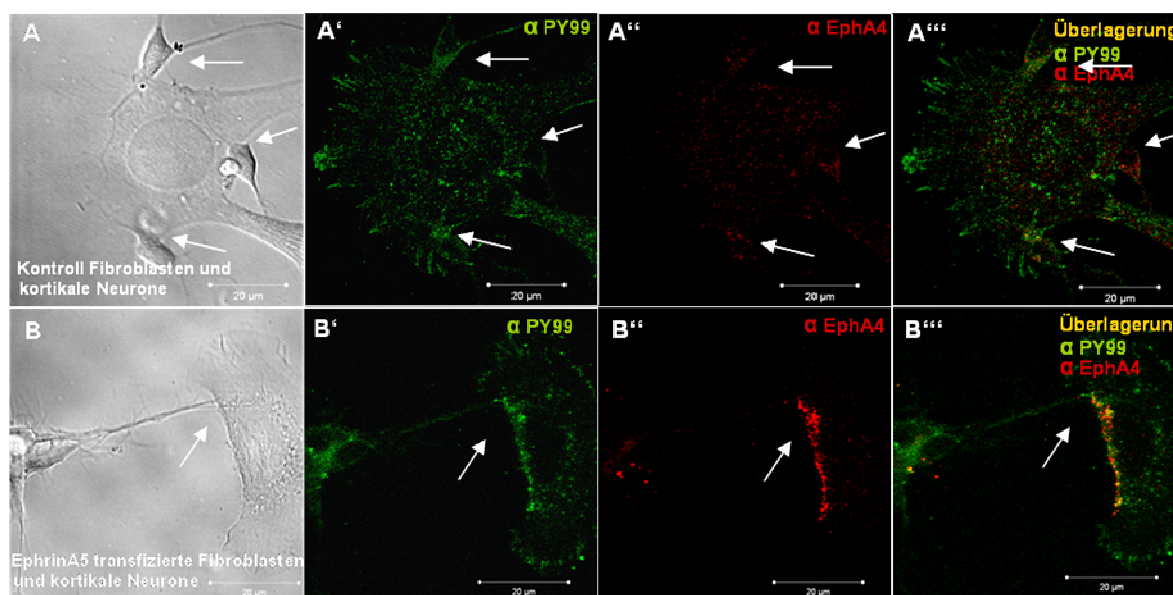


Abb. 4.1.7.1.: Co-Kulturen aus EphrinA5-transfizierten Fibroblasten mit kortikalen Neuronen (rechte Reihe, B-B''') nach 2 d *in vitro* zeigen aktivierte EphA-Rezeptoren an den Kontaktstellen, die mit Kontroll-Fibroblasten (linke Reihe, A-A''') nicht nachgewiesen werden können. Die Phasenkontrastaufnahmen der Co-Kulturen sind jeweils in (A) und (B) dargestellt. (A') und (B') zeigt die anti-PY-99 und (A'') und (B'') die anti EphA4-Immunfärbungen. In (A''') und (B''') sind die Überlagerungen aus (A') und (B') mit (A'') und (B'') dargestellt. Pfeile markieren die Kontaktstellen zwischen Neuriten und Fibroblasten. Balken: 20 μm .

Da die in Abschnitt 4.5. dargestellten Ergebnisse zeigten, dass das Substratsignal nur nach Permeabilisierung mittels Triton-X-100 detektiert werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die Rezeptoren mit umgebenden Membranfragmenten abgegeben werden. Um nachzuweisen, dass die EphA-Rezeptoren tatsächlich von den Neuronen an die EphrinA5-exprimierenden Fibroblasten

abgegeben werden, wurden primäre Neurone mit einem Vektor für membranständiges EYFP elektroporiert, der in *E.coli* amplifiziert, isoliert und mittels Restriktionsverdau unter Verwendung des Enzyms Pst-1 kontrolliert (siehe Material und Methoden) wurde. Die Neurone wurden dann mit EphrinA5-transfizierten oder Kontroll-Fibroblasten für 2 Tage *in vitro* co-kultiviert und anschließend mit einem anti-EphA4 oder anti-PY99 Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Ziel des Versuches war es, grün-fluoreszierende neuronale Membranpartikel auf der Membran von EphrinA5-transfizierten Fibroblasten nahe der Kontaktstellen mit EYFPmem transfizierten Neuronen nachzuweisen, die mit einem Signal für EphA4 oder PY99 co-lokalisiert sind. In Abbildung 4.1.7.3. A-D sind Co-Kulturen von EphrinA5-transfizierten Fibroblasten mit EYFPmem transfizierten primären kortikalen Neuronen dargestellt. Die Abbildungen 4.1.7.3. A und B zeigen Co-Kulturen mit anschließender anti-EphA4 Immunmarkierung, wobei in B-B''' die Kontaktstellen zwischen Neuron und Fibroblast jeweils vergrößert dargestellt sind. In Abb. 4.1.7.3. C und D ist eine Co-Kultur mit nachfolgender anti-PY99 Färbung abgebildet. Auch hier sind in D-D''' die Kontaktstellen zwischen Neuron und Fibroblast aus C-C''' herausvergrößert. Nahe den Kontaktstellen von EphrinA5 transfizierten Fibroblasten und EYFPmem exprimierenden Neuronen (Abb. 4.1.7.3. A-D) konnten grün fluoreszierende Membranpartikel auf der Oberfläche der Fibroblasten detektiert werden (Abb. 4.1.7.3. A', B', C', D'). In Co-Kulturen mit Kontroll-Fibroblasten konnten diese Membranpartikel nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.1.7.2. A, A', B, B'). Immunfärbungen konnten zeigen, dass viele dieser EYFPmem enthaltenen Membranpartikel auf den EphrinA5 transfizierten Fibroblasten mit einer anti-EphA4 (Abb. 4.1.7.3. A'-A''', B'-B''') oder PY99 Markierung (Abb. 4.1.7.3. C'-C''', D'-D''') co-lokalisiert waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine EphA Rezeptor-Abgabe auch nach Zell-Zell-Kontakt mit EphrinA-Liganden exprimierenden Fibroblasten stattfinden kann. Die EphA-Rezeptorabgabe könnte somit einen weiteren Mechanismus darstellen, um repulsive Interaktionen zwischen Zellen nach adhäsiver Liganden-Rezeptorbindung zu ermöglichen.

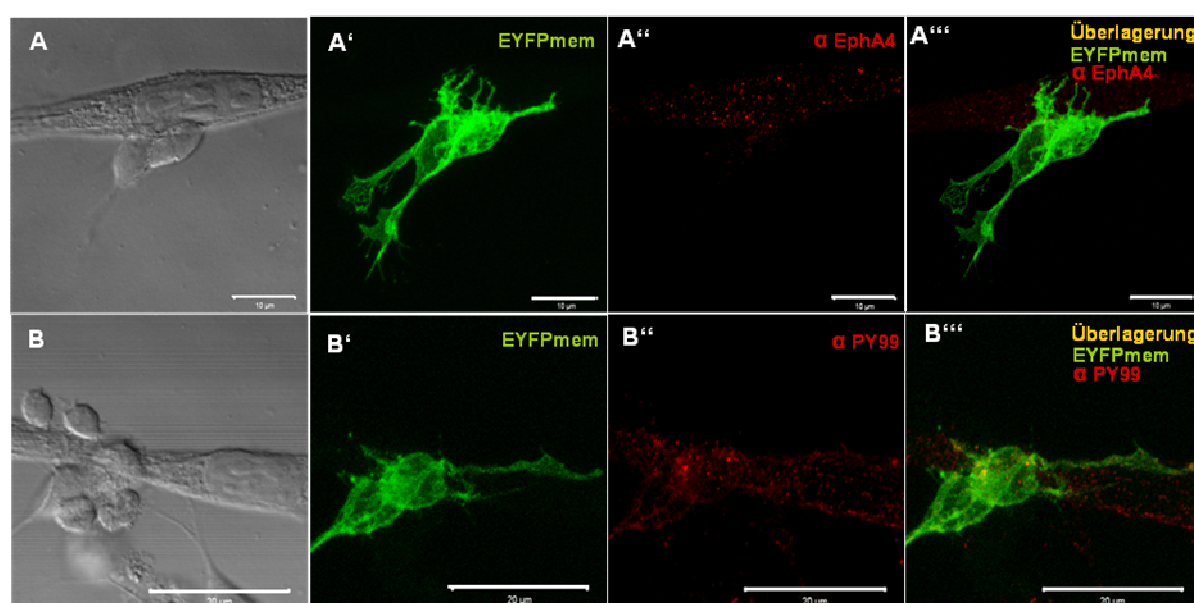


Abb. 4.1.7.2.: EYFPmem-transfizierte Neurone in Co-Kultur mit Kontroll-Fibroblasten (Durchlichtaufnahmen in A und B) zeigen keine grün fluoreszierenden Membranpartikeln nahe der Kontaktstellen auf den Fibroblasten (A', B'). Die Immunmarkierung gegen EphA4 (A'') und PY99 (B'') resultierte nur in einer Hintergrundfärbung. Balken: 10 µm in A-A''', 20 µm in B-B'''.

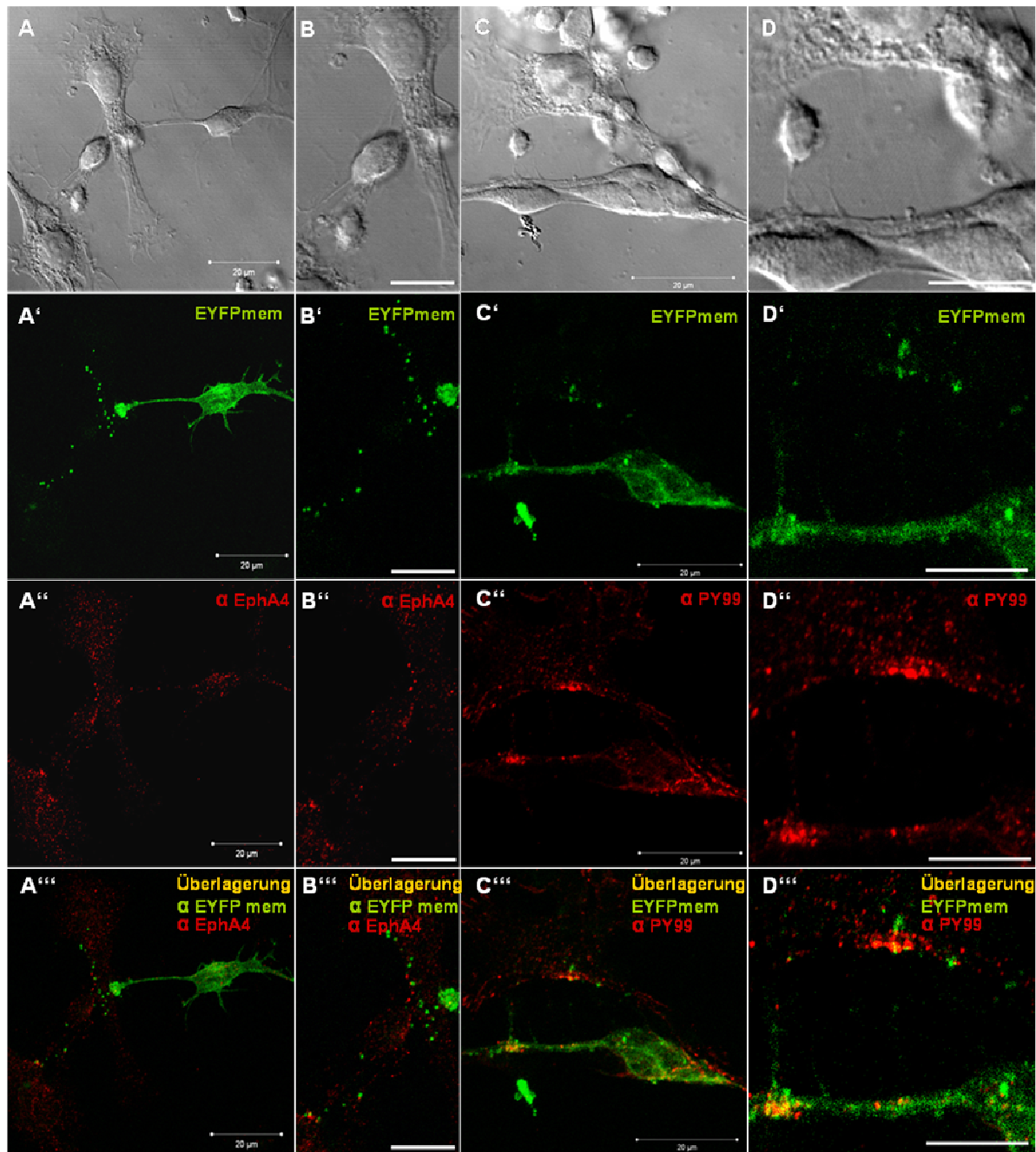


Abb. 4.1.7.3.: Korticale Neurone geben EphA-Rezeptoren an EphrinA5-transfizierende Fibroblasten ab. Durchlichtaufnahmen von Co-Kulturen von EYFPmem-transfizierten Neuronen mit EphrinA5-transfizierten Fibroblasten sind in (A-D) dargestellt. (B-B'', D-D'') zeigt vergrößerte Ausschnitte der Kontaktstellen zwischen Neuronen und Fibroblasten aus (A-A'') und (B-B''). Grün-fluoreszierende Membranpartikel der EYFPmem transfizierten Neurone konnten nahe der Kontaktstellen detektiert werden (A'-D'). Viele dieser EYFPmem Membranpartikel auf den EphrinA5 transfizierten Fibroblasten zeigten bei Überlagerung eine Co-Lokalisation mit anti-EphA4 (A'', B'') und anti-PY99-Markierungen (C'', D''). Balken: 20 µm in (A-A'') und (C-C''); 10 µm in (B-B'') und (D-D'').

4.2. Der Einfluß von EphrinA5 auf die tangential Migration

GABAerger Interneurone *in vitro*

Der Kortex besteht aus Pyramidenzellen und Interneuronen, wobei letztere in den ganglionischen Eminenzen gebildet werden und tangential in den Kortex einwandern (Rakic, 1971, 1974; Misson et al., 1991; Anderson et al., 1997; Tamamaki et al., 1997; de Castro et al., 1999; Nadarajah et al., 2001). Wie im ersten Projekt gezeigt werden konnte, steigert EphrinA5 die Motilität kortikaler Neurone. Daraus folgend ergab sich die Fragestellung, ob das EphrinA5 auch bei der tangentialen Migration kortikaler Interneurone beteiligt sein könnte. Darüber hinaus zeigen die Eph-Rezeptoren und deren Liganden eine ausgeprägte zeitlich und räumlich verschiedene Expression im basalen Telencephalon (Niehage et al., 2005), was eine Involvierung dieses Systems bei der Regulation der tangentialen Migration vermuten lässt.

4.2.1. Methoden zur Darstellung und Quantifizierung migrierender Neurone *in vitro*

Um den Einfluß der Ephrine auf die tangential Migration näher zu charakterisieren, wurde ein *in vitro* Ansatz gewählt, bei dem die tangential Migration kortikaler Interneurone der MGE dargestellt und unter Manipulation des Eph/Ephrin Systems durch Zugabe von exogenem EphrinA5-Fc *in vitro* untersucht werden sollte. Aus Literaturangaben war bekannt, dass die kortikalen Interneurone an den Embryonaltagen E12,5 bis E14,5 hauptsächlich in der MGE entstehen und von dort dorsal oder ventral der striatalen Anlage in den Kortex migrieren (Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marin et al., 2001b). Aus diesem Grund wurden in dem *in vitro*-Modell E14 Embryonen verwendet und die tangential Migration von MGE-Neuronen des Embryonaltages 14 auf coronalen Gehirnschnitten dargestellt und untersucht. Um migrierende Zellen auf coronalen Schnitten *in vitro* zu visualisieren, wurden zwei verschiedene Methoden gewählt. Zum einen wurden Wolfram-Kugeln mit einem kommerziell erhältlichen *Cell-Tracker*-Farbstoff beschichtet und lokal in die Ventrikularzone und oberen Subventrikularzone der medialen ganglionischen Eminenz coronaler Schnitte appliziert, die dann für 2 Tage *in vitro* kultiviert wurden. Dieser Farbstoff wird über die Zellmembran von lebenden Zellen aufgenommen. Die Chloromethylgruppen des Farbstoffes bilden mit intrazellulären Thiolgruppen ein membranundurchlässiges fluoreszierendes Produkt, wodurch gewährleistet wird, dass der Farbstoff nicht auf Nachbarzellen übertragen wird. In Abb. 4.2.1. sind Beispiele für die Markierung migrierender Neurone mit *Cell-Tracker*-Farbstoff auf Wildtyp Schnitten dargestellt. Die dunklen Bereiche in der Ventrikularzone (Abb. 4.2.1. B) stellen die applizierten Wolfram-Kugeln dar, die vorher mit *Cell-Tracker*-Farbstoff beschichtet wurden. Eine weitere Methode ist die homotypische Transplantation von grün fluoreszierenden Explantaten der Ventrikularzone der medialen ganglionischen Eminenz von E14 EGFP-Embryonen auf coronale Schnitte von E14 Wildtyp-Embryonen. In Abb. 4.2.1. C ist ein Beispiel für die Migration homotopisch transplanteder EGFP-MGE Neurone nach 48 h *in vitro* dargestellt. Beide Methoden ergaben ein sehr ähnliches Muster migrierender Zellen. Der Großteil der Neurone wanderte entlang der VZ und oberen SVZ der MGE und LGE. Ein geringer Teil der Zellen migrierte in die striatale Anlage. Allerdings unterschieden sich die beiden Methoden bezüglich der Dauer und Intensität der Fluoreszenz. Die Fluoreszenz der

EGFP-Zellen war deutlich stabiler und intensiver gegenüber der Fluoreszenz des *Cell Tracker*-Farbstoffes. Außerdem war die Morphologie der einzelnen migrierenden EGFP-Zellen deutlich besser zu erkennen. Aus diesen Gründen wurde für alle nachfolgenden Experimente die Methode der homotypischen Transplantation angewendet.

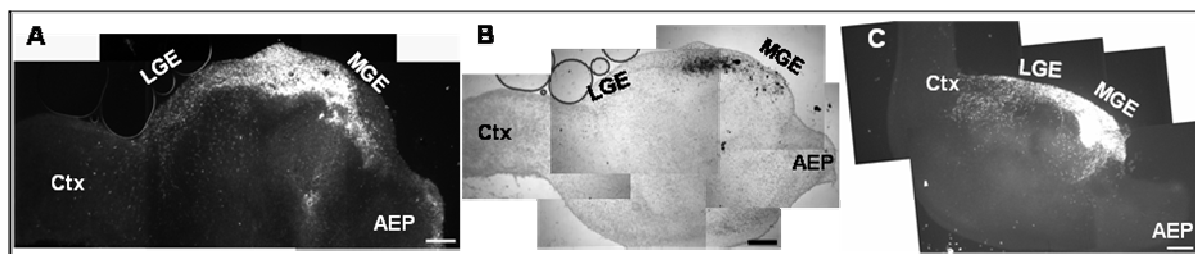


Abb. 4.2.1.: Migrierende Neurone der MGE auf coronalen Schnitten *in vitro* wurden mit 2 Methoden dargestellt. (A), Fotomontage von Fluoreszenzaufnahmen eines coronal geschnittenen Gehirnhemisphäre eines E14 Embryos, bei dem mit Cell-Tracker beschichtete Wolframkugeln in die VZ und obere SVZ appliziert wurden. Der Schnitt wurde anschließend für 2 Tage *in vitro* kultiviert. (B), Darstellung der Montage von Phasenkontrastaufnahmen der in (A) gezeigten Fluoreszenzaufnahme. (C), Fotomontage von Fluoreszenzaufnahmen eines E14 Wildtyp-Schnittes nach homotypischer Transplantation von MGE-Explantaten aus EGFP-Embryonen auf Wildtyp-Schnitte nach 2 Tagen *in vitro*. Balken = 200 μ m.

Um das Migrationsmuster der Interneurone aus der MGE im basalen Telencephalon der verschiedenen Schnitte nach 48 h *in vitro* zu quantifizieren, wurde jeder Schnitt vermessen und ein bestimmter Bereich relativ zu den Ausmaßen des Schnittes in der LGE ausgewählt, der über die gesamte dorsal-ventrale Ausdehnung in 25 Regionen unterteilt wurde (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.10.1). Die Region 1 wurde der Ventrikularzone, die Regionen 2 bis 7 der Subventrikularzone zugeordnet. Für jede der 25 Regionen wurde die Fluoreszenzintensität ermittelt, wobei der höchste gemessene Wert für jeden Schnitt auf 100 % normiert wurde. Die Quantifizierung der Migration der EGFP-MGE Transplantationsexperimente nach 48 h *in vitro* (Abb. 4.2.1.1. A) ergab die höchste Fluoreszenzintensität in der Region 1, der Ventrikularzone. Die Fluoreszenzintensitäten fielen dann bis zur Region 7 auf 20 % ab (Abb. 4.2.1.1. B; rechts). Ab der Region 11 konnten kaum noch Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Die Zellen migrierten somit aus dem Explantat entlang der Ventrikular- und Subventrikularzone des Wildtyp-Schnittes in der lateralen ganglionischen Eminenz. Die striatale Anlage wurde weitestgehend vermieden.

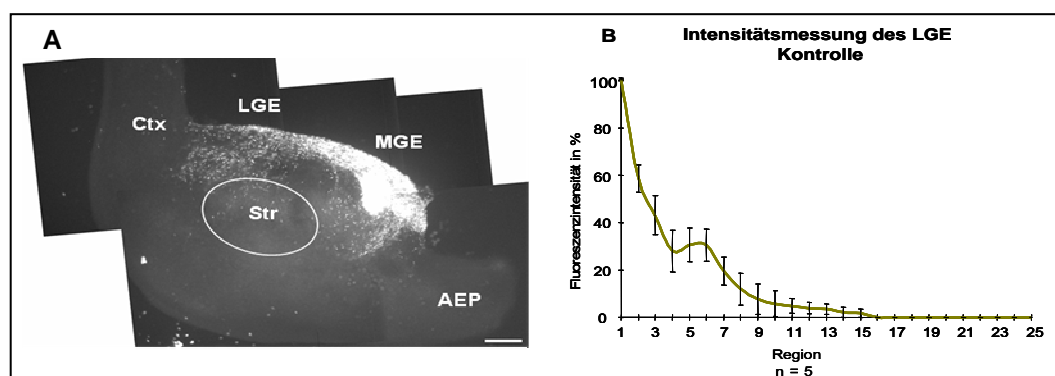


Abb. 4.2.1.1: Tangential migrierende Neurone aus einem homotopisch transplantiertem Explantat aus der MGE von EGFP-Embryonen auf einem Wildtyp Schnitt nach 2 Tagen *in vitro* wandern entlang der Ventrikular- und Subventrikularzone der LGE und vermeiden die striatale Anlage. (A), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen einer coronal geschnitten Wildtyp-Gehirnhemispäre (E14) mit einem EGFP Explantat der MGE nach 2 Tagen *in vitro*. (B), normierte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE. Balken = 200 µm; n = Anzahl ausgewerteter Schnitte. AEP = Area Entopeduncularis; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage.

4.2.2. Vergleich der tangentialen Migration kortikaler Interneurone im *in vitro*-Modells mit der Migration *in vivo*

Die Alterstufen der verwendeten Gehirne (E14) und das Migrationsmusters der MGE-EGFP Neurone *in vitro*, die hauptsächlich unter Vermeidung der striatalen Anlage Richtung Kortex wandern, legen nahe, dass es sich bei den migrierenden EGFP-Neuronen im Wesentlichen um kortikale Interneurone handelt. Um dies näher zu charakterisieren, wurde eine *in situ*-Hybridisierung gegen *Lhx6* an den coronalen Schnitten mit homotypischer Transplantation nach 48 h *in vitro* durchgeführt, da bekannt ist, dass migrierende kortikale Interneurone aus der MGE das LIM-Homeodomänen-Gen *Lhx6* exprimieren (Lavdas et al., 1999). Das Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung an Schnitten mit EGFP-MGE Transplantaten nach 48 h *in vitro* ergab ein *Lhx6*-Expressionsmuster (Abb. 4.2.2. C), das weitestgehend mit dem Migrationsmuster der EGFP-MGE Neurone übereinstimmt (Abb. 4.2.2. D). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass es sich bei den migrierenden EGFP-MGE Neuronen hauptsächlich um kortikale Interneurone handelt.

Um das Migrationsmuster *in vitro* mit der Migration kortikaler Interneurone *in vivo* zu vergleichen, wurde eine ergänzende *in situ*-Hybridisierung an frischen coronalen Kryostat-Schnitten von E14-Gehirnen durchgeführt. Die *Lhx6*-Sonde ergab eine deutliche Markierung der basalen MGE bis hin zur Ventrikularzone, die allerdings nicht markiert war (Abb. 4.2.2. A). In der LGE sind Zellen markiert, die auf zwei Migrationswegen, oberhalb der striatalen Anlage in tiefe Regionen des Kortex und unterhalb der striatalen Anlage in superfizielle Schichten des Kortex einwandern. Auch in der LGE ist die Ventrikularzone deutlich frei von *Lhx6*-positiven Zellen (Abb. 4.2.2. A). Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit Literaturangaben, die von E13,5 bis E17 *Lhx6*-markierte migrierende Zellen aus

der MGE in der subventrikulären Zone und in basalen Schichten der LGE nachweisen konnten (Lavdas et al., 1999; Marin et al., 2003b).

Vergleicht man nun die Migration *Lhx6*-positiver Interneurone *in vivo* mit der Wanderung der MGE-EGFP Neurone *in vitro*, so sind grundlegende Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede festzustellen. Sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* migrieren die Neurone aus der MGE über die LGE in den Kortex ein. Es konnten dabei keine Zellen beobachtet werden, die aus der MGE in die AEP einwandern. Außerdem vermeiden die kortikalen Interneurone den Bereich der striatalen Anlage, was ebenfalls in Übereinstimmung mit der Migration *in vivo* steht (Marin et al., 2003b). Der auffälligste Unterschied besteht in der Migration der Interneurone entlang der VZ der MGE und LGE *in vitro*, eine Region, in der *in vivo* keine migrierenden kortikalen Interneurone beobachtet werden können. *In vitro* Studien anderer Arbeitsgruppen zeigen ebenfalls dieses veränderte Migrationsmuster der MGE-Neurone in der VZ (Anderson et al., 2001; Marin et al., 2003b). Dieser Effekt könnte auf veränderte Expressionsmuster von Signalmolekülen als *in vitro* Artefakt zurückzuführen sein. Führt man eine *in situ* Hybridisierung gegen *Lhx6* an dicken Schnitten mit EGFP-MGE Transplantaten durch, die nur für 2 h *in vitro* kultiviert wurden (Abb. 4.2.2. B), so erkennt man deutlich, dass die VZ nicht gefärbt ist, hingegen die SVZ und basale Schichten der MGE ähnlich der *in vivo*-Situation. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass nicht die Präparation selbst die veränderte Migration kortikaler Interneurone entlang der VZ bewirkt, sondern die Kultivierung der Schnitte für eine bestimmte Zeit *in vitro*. Das die Markierung in der LGE der Schnitte nach 2 h *in vitro* ausbleibt, könnte an der geringeren Zelldichte *Lhx6*-positiver Zellen gegenüber der MGE liegen (Abb. 4.2.2. A). An dicken Schnitten („whole mounts“) lassen sich einzelne Zellen deutlich schlechter markieren als an Kryostatschnitten. Regionen in denen viele Zellen eine Expression der entsprechenden mRNA aufweisen, lassen sich hingegen gut nachweisen. Nach 2 h *in vitro* waren noch keine Zellen aus dem EGFP-MGE Explantat in die LGE ausgewandert. Zusätzlich sind vermutlich aufgrund des früheren Zeitpunktes der Fixation auch weniger endogene kortikale Interneurone des Wildtyp-Schnittes in der LGE vorzufinden als bei den Schnitten nach 48 h *in vitro*. Somit scheinen bei E14+2 h *in vitro* zu wenig *Lhx6*-positive Zellen in der LGE lokalisiert zu sein, um sie mit *in situ* Hybridisierung nachweisen zu können.

Zusätzlich zum Einwandern der Interneurone in die VZ *in vitro* kann ein weiterer Unterschied zur der Migration *in vivo* beobachtet werden. *In vitro* konnten nur Neurone beobachtet werden, die oberhalb der striatalen Anlage migrierten, es konnten keine EGFP-Neurone detektiert werden, die aus der MGE unterhalb des sich entwickelnden Striatums auswanderten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Explantate aus der VZ und oberen SVZ der MGE entnommen und homotypisch in die VZ transplantiert wurden. Zellen dieser Region könnten ausschließlich dorsal in den Kortex wandern, wohingegen Neurone aus tieferen Schichten der SVZ ventral der striatalen Anlage in den Kortex migrieren könnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz einiger Unterschiede mit diesem *in vitro* Modell die tangentielle Migration mit ihren wesentlichen Charakteristika dargestellt werden kann, weshalb es zur weiteren Untersuchung des Einflusses des Eph/Ephrin Systems auf die tangentielle Migration kortikaler Interneurone *in vitro* angewendet wurde.

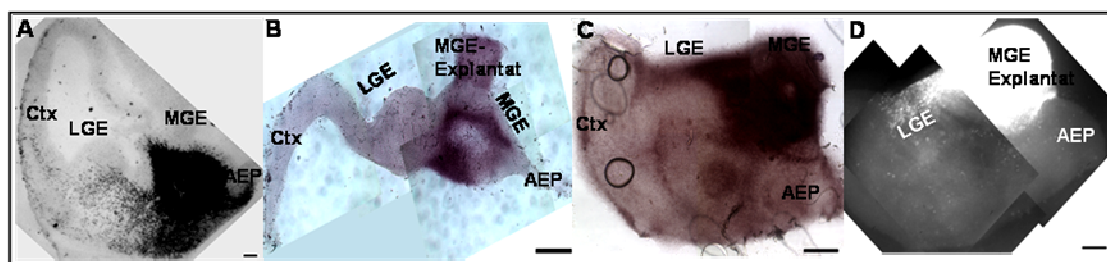


Abb. 4.2.2.: Vergleich der *in situ* Hybridisierungen mit einer Ihx6-antisense Sonde an (A), Kryostatschnitten (E14) und dicken Schnitten nach (B), 2 h *in vitro* und (C), 48 h *in vitro*. (D), Fotomontage von Fluoreszenzaufnahmen der coronal geschnittenen Gehirnhemisphäre aus (C) vor der *in situ* Hybridisierung nach 2 Tagen *in vitro*. Balken = 200 µm.

4.2.3. Untersuchung der Expressionsmuster von ausgewählten Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden *in vitro*

Die in Abschnitt 4.2.2. dargestellten Untersuchungen haben ergeben, dass sich die migrierenden kortikalen Interneurone aus der MGE *in vitro* teilweise verschieden von der *in vivo*-Situation verhalten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass möglicherweise Signalmoleküle, die in die Regulierung der tangentialen Migration involviert sind, ihre Expressionsmuster *in vitro* verändern könnten. Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Eph/Ephrin-Systems auf die tangential Migration der MGE-Neurone *in vitro* untersucht werden sollte, wurden die Expressionsmuster relevanter Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden nach 2 Tagen *in vitro* bestimmt. Die Auswahl der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden, deren Expressionsmuster *in vitro* untersucht wurde, basierte auf Expressionsdaten von Niehage et al., 2005, die als Referenz für die *in vivo*-Expression verwendet wurden. Die Auswertung der Expressionsdaten bezieht sich nur auf das basale Telencephalon.

Vergleicht man das EphA3-Expressionsmuster an dicken Schnitten nach 48 h *in vitro* mit der *in vivo* Referenz, so stimmen die Expressionsmuster weitestgehend überein. Es ist eine Markierung in der Ventrikularzone und der Subventrikularzone der LGE und MGE zu erkennen (Abb. 4.2.3.1. A). Da die Expression nicht der Ausdehnung der migrierenden EGFP-MGE Neurone entspricht (Abb. 4.2.3.1. B), könnte der EphA3-Rezeptor ein Kandidatenmolekül darstellen, das von Neuronen der VZ und SVZ, nicht jedoch von den migrierenden Zellen selbst exprimiert wird.

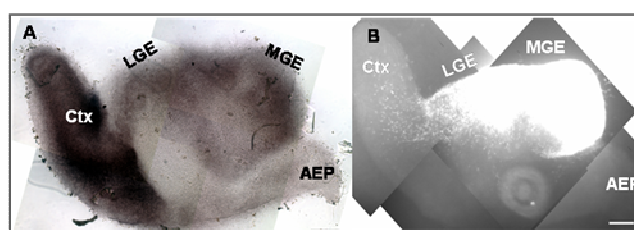


Abb. 4.2.3.1.: *In situ*-Hybridisierung gegen EphA3 an einer coronal geschnittenen Gehirnhemisphäre mit EGFP-MGE Transplantat nach 48 h *in vitro*. (A), Rekonstruktion der Durchlichtaufnahmen der *in situ*-Hybridisierung. (B) Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen der migrierenden transplantierten EGFP-MGE Neurone auf einem coronalen Gehirnschnitt nach 48 h *in vitro* vor der *in situ*-Hybridisierung. Balken = 200 µm.

Als nächstes wurde eine EphA4 *in situ*-Hybridisierung an Gehirnschnitten mit transplantierten MGE-Explantaten nach 2h (A) und nach 48 h (B) *in vitro* durchgeführt, dessen Ergebnis in Abb. 4.2.3.2. dargestellt ist. Nach 2 h *in vitro* erkennt man in der Ventrikularzone, dem Explantat und vor allem in der Subventrikularzone der Eminenzen eine Markierung. Die starke Färbung der Subventrikularzone und die leichtere Markierung der Ventrikularzone der Eminenzen entsprechen der *in vivo*-Expression von EphA4 (Niehage et al., 2005). Nach 48 h *in vitro* ergab die EphA4-Markierung allerdings ein verändertes Muster. Zusätzlich zur Expression in der Subventrikularzone ist eine starke Färbung der Ventrikularzone der LGE zu erkennen. Somit nimmt die EphA4-Rezeptor Expression nach 48 h *in vitro* in der Region deutlich zu, in der die Neurone *in vitro* migrieren (Abb. 4.2.3.2. B, C). Diese Expressionsdaten lassen die Vermutung zu, dass der EphA4 Rezeptor von den migrierenden MGE-Neuronen exprimiert wird.

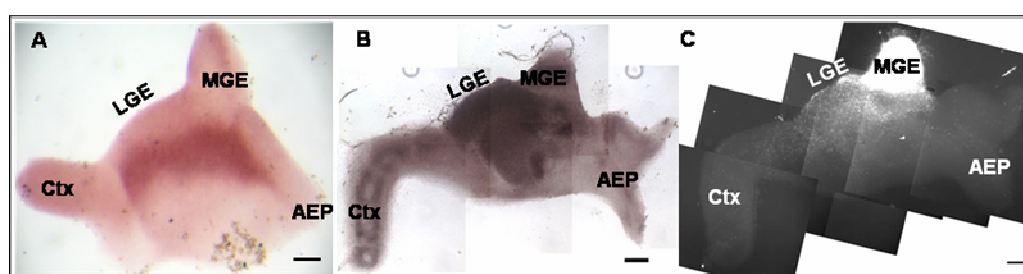


Abb. 4.2.3.2: *In situ*-Hybridisierung gegen EphA4 an dicken Schnitten nach (A), 2 h und (B), 48 h *in vitro*. (A) und (B), Durchlichtaufnahmen der *in situ*-Hybridisierungen. (C), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen der migrierenden transplantierten EGFP-MGE Neurone nach 48 h *in vitro* vor der *in situ*-Hybridisierung. Balken = 200 µm.

Der EphA5-Rezeptor stellt einen weiteren Rezeptor dar, der *in vitro* sein Expressionsmuster verändert. Nach 48 h *in vitro* erkennt man eine deutliche Markierung der VZ und SVZ der MGE, die LGE zeigt keine Färbung (Abb. 4.2.3.3. A). Die Referenzdaten geben hingegen eine Markierung der VZ der LGE und der SVZ der MGE an. Da eine Färbung der LGE nach 48 h *in vitro* ausbleibt, ist eine Expression des EphA5-Rezeptors auf den migrierenden MGE-Neuronen unwahrscheinlich.

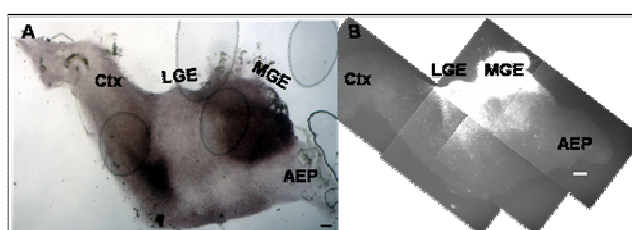


Abb. 4.2.3.3.: *In situ*-Hybridisierung gegen EphA5 an dicken Schnitten nach 48 h *in vitro*. (A), Rekonstruktion von Durchlichtaufnahmen der *in situ*-Hybridisierung gegen EphA5 und (B), Rekonstruktion der Fluoreszenzaufnahmen der migrierenden transplantierten EGFP-MGE Neurone nach 48 h *in vitro* vor der *in situ*-Hybridisierung. Balken = 200 µm.

Aus den Referenzdaten ist weiterhin bekannt, dass EphrinA5 an den Embryonaltagen E14 und E16 in der AEP und der VZ der MGE und der LGE exprimiert ist (Niehage et al., 2005). Um die Expression

von EphrinA5 *in vitro* zu bestimmen, wurden *in situ* Hybridisierungen an dicken Schnitten nach 2 h und nach 48 h *in vitro* durchgeführt. Die *in situ* Hybridisierung gegen EphrinA5 an Schnitten nach 2 h *in vitro* ergab ein Expressionsmuster, was mit dem *in vivo*-Expressionsmuster von EphrinA5 weitestgehend übereinstimmt. Sowohl im AEP als auch in der VZ der LGE und MGE ist eine Markierung zu erkennen (Abb. 4.2.3.4. A). Nach 48 h *in vitro* allerdings konnte kein EphrinA5-Signal mehr in der VZ der LGE und MGE nachgewiesen werden, man erkennt nur noch die Markierung in der AEP. Dies könnte daran liegen, dass die Menge an EphrinA5-mRNA in der VZ der MGE und LGE nach 48 h *in vitro* unter der Nachweisgrenze liegt oder dass EphrinA5 in dieser Region nicht mehr exprimiert wird. In jedem Falle ist eine Abnahme des EphrinA5 Signals in der Ventrikularzone der MGE und LGE nach 48 h *in vitro* zu verzeichnen. Da in der AEP noch ein deutliches EphrinA5-Signal zu erkennen ist, könnte die Herunterregulation von EphrinA5 regionenspezifisch für die VZ der LGE und MGE sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das *in vitro*-Modell eine regionenspezifische Veränderung der Expressionmuster einiger untersuchter Vertreter des EphA/EphrinA-Systems aufweist. Die Ventrikularzone der MGE und LGE zeigt nach 48 h *in vitro* eine Reduzierung des EphrinA5-Signals und eine Zunahme der EphA4- und Lhx6-Expression.

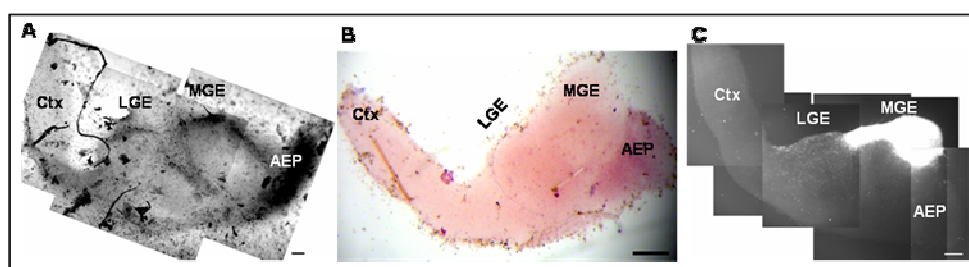


Abb. 4.2.3.4: *In situ*-Hybridisierung gegen EphrinA5 an dicken Schnitten nach (A), 2 h und (B), 48 h *in vitro*. (A) und (B), Durchlichtaufnahmen der *in situ*-Hybridisierung, (C), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen der migrierenden transplantierten EGFP-MGE Neurone nach 48 h *in vitro* vor der *in situ*-Hybridisierung. Balken = 200 μ m.

4.2.4. EphrinA5-Fc hat einen repulsiven Effekt auf die Neurone der ganglionischen Eminenzen *in vitro*

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass sich das Migrationsmuster der kortikalen Interneurone *in vivo* von der Migration *in vitro* auf coronalen Schnitten (E14) hinsichtlich des Einwanderns in die Ventrikularzone der ganglionischen Eminenzen unterscheidet. Wie Abb. 4.2.1.1. A und B zeigt, migrieren die MGE-Zellen hauptsächlich in der Ventrikular- und oberen Subventrikularzone *in vitro*, wohingegen die Ventrikularzone *in vivo* freigelassen wird (Abb. 4.2.2. A). Betrachtet man die EphrinA5 Expression *in vivo*, so erhält man ein deutliches Signal in der Ventrikularzone der MGE und LGE, der Region die von den migrierenden MGE-Neuronen *in vivo* vermieden wird (Niehage et al., 2005). *In vitro* wird die Expression von EphrinA5 in der Ventrikularzone der LGE und MGE herunterreguliert und die Neurone zeigen eine intensive Migration in dieser Region (Abb. 4.2.3.4. A-C). Dies deutet auf einen repulsiven Effekt von EphrinA5 auf die migrierenden Zellen *in vivo* hin.

Um einen möglichen repulsiven Effekt von EphrinA5 auf die Neurone der Eminenzen des basalen Telencephalons zu untersuchen, wurden diese analog der Experimente bei kortikalen Neuronen im Streifenassay mit alternierenden Streifen aus rekombinanten geclusterten EphrinA5-Fc und Kontrollprotein getestet. Dafür wurden dissoziierte Neurone der lateralen und medialen Eminenzen von Embryonen des Embryonaltages 14 verwendet. Wie in Abb. 4.2.4. zu erkennen ist, zeigen sowohl die Zellen der LGE als auch die der MGE ein präferentielles Wachstum in den Kontrollstreifen (Abb. 4.2.4. A und B). 69% der Zellen der lateralen ganglionischen Eminenz vermeiden die EphrinA5-Fc Streifen. Zellen der medialen ganglionischen Eminenz zeigen zu 60 % ein bevorzugtes Wachstum auf den Kontroll-Streifen. Da das verwendete Zellmaterial aus präparationstechnischen Gründen von ganzen Eminenzen stammt, konnten differenzielle Antworten verschiedener Subpopulationen von Zellen des basalen Telecephalons in diesem Test nicht bestimmt werden. Jedoch kann man sagen, dass EphrinA5-Fc einen repulsiven Effekt auf einen Großteil der Zellen der LGE und MGE hat. Analog der ausführlichen Untersuchungen der kortikalen Neurone legen die Ergebnisse des Streifenassays mit Neuronen der Eminenzen außerdem nahe, dass EphrinA5-Fc auch die Motilität der MGE und LGE-Neurone steigert, da die Zellen gleichmäßig auf dem Streifenfeld verteilt aufgebracht wurden und nach 2 Tagen *in vitro* präferentiell in den Kontroll-Streifen lokalisiert waren.

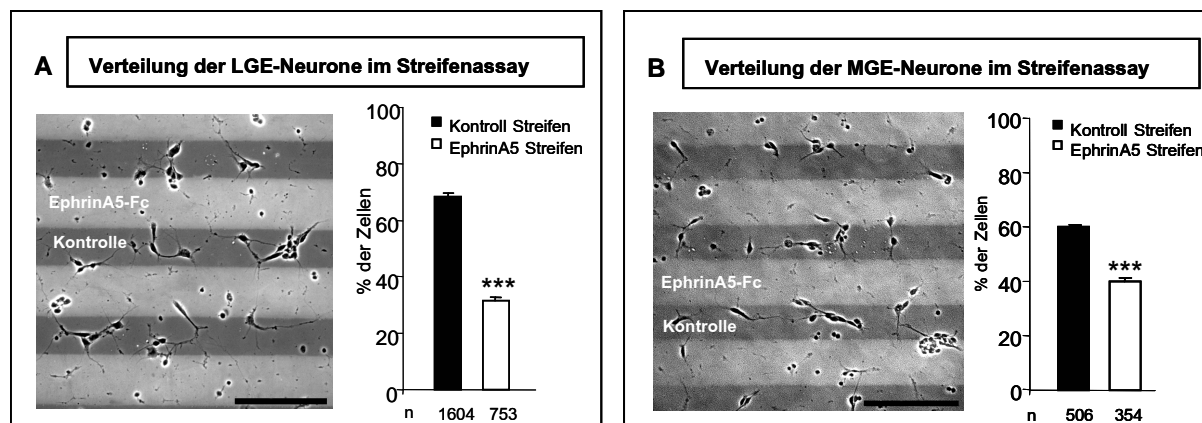


Abb. 4.2.4.: Die Neurone der LGE und MGE zeigen im Streifenassay ein präferentielles Wachstum in den Kontroll-Streifen. (A), Phasenkontrastaufnahme von LGE-Neuronen nach 48 h *in vitro* auf alternierenden Streifen von EphrinA5-Fc und Kontrollprotein (links) und die Quantifizierung der Verteilung der LGE-Neurone im Streifenassay (rechts). (B), Phasenkontrastaufnahme von MGE-Neuronen nach 48 h *in vitro* auf alternierenden Streifen von EphrinA5-Fc und Kontrollprotein (links) und die Quantifizierung der Verteilung der MGE-Neurone im Streifenassay (rechts). Balken = 100 µm; n = Anzahl der Zellen.

4.2.5. Der Einfluß von EphrinA5-Fc auf die tangentielle Migration *in vitro*

Wie im Streifenassay gezeigt werden konnte, hat EphrinA5 einen repulsiven und Motilitäts-steigernden Effekt auf einen Großteil der Zellen der MGE und LGE. Außerdem wurde dargelegt, dass EphrinA5 in der Ventrikularzone der MGE und LGE nach 48 h *in vitro* nicht mehr nachweisbar war und dass die meisten kortikalen Interneurone *in vitro* in der Ventrikularzone migrierten. Somit liegt die Vermutung nahe, dass EphrinA5 an der Regulation der tangentialen Migration ausdifferenzierter kortikaler Interneurone beteiligt sein könnte. Um dies zu untersuchen, sollte versucht werden durch exogenes EphrinA5-Fc die *in vivo* Expression in der Ventrikularzone zu rekonstruieren. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen deuten darauf hin, dass EphA3 auf den Zellen der Ventrikularzone und oberen Subventrikularzone exprimiert ist. Bindungsstudien ergaben, dass EphrinA5 mit der höchsten Bindungsaffinität an den EphA3-Rezeptor bindet (Monschau et al., 1997; Flanagan et al., 1998). Da EphrinA5-Fc als Oligomer vorliegt und im Überschuß zugegeben wurde, besteht die Möglichkeit, dass nur ein Teil der Epitope der oligomeren EphrinA5-Fc Proteine an die EphA3-Rezeptoren binden und es noch freie Bindungsstellen gibt, die dann an die EphA4-Rezeptoren der migrierenden Neurone aktivieren könnten.

Um zu überprüfen, ob EphrinA5-Fc lokal an die Zellen der Ventrikularzone *in vitro* bindet, wurden coronale Schnitte 2 Tage *in vitro* mit 5 µg/ml EphrinA5-Fc im Medium kultiviert und anschließend eine immunhistochemische Färbung mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Mensch-IgG Antikörper gegen den Fc-Teil des rekombinanten EphrinA5-Fc Proteins durchgeführt. Wie in Abbildung 4.2.5. zu erkennen ist, zeigt die Markierung die höchste Intensität in der Ventrikularzone der LGE und MGE. Weiterhin sind auch einzelne gefärbte Zellen in der Subventrikularzone der LGE und MGE, als auch im Kortex zu erkennen. In der AEP ist keine Färbung zu erkennen. Somit bindet EphrinA5-Fc, neben einzelnen Zellen in der Subventrikularzone der Eminenzen und im Kortex, hauptsächlich an die Zellen der Ventrikularzone.

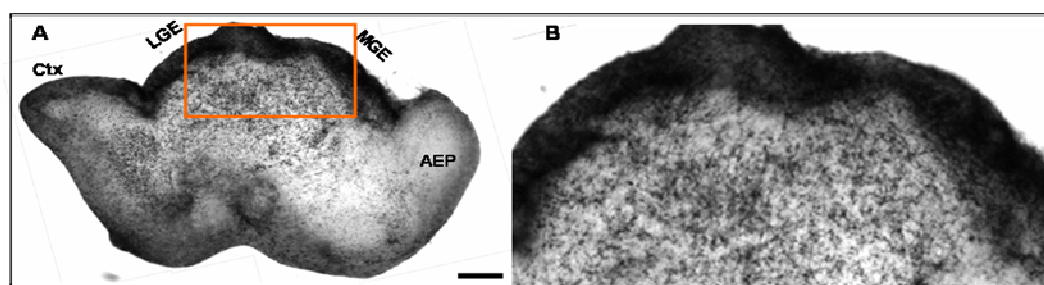


Abb. 4.2.5.: Die Bindungsstelle von EphrinA5-Fc an Schnittkulturen *in vitro* nach immunhistochemischer Markierung mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Mensch IgG Antikörper. (A), Rekonstruktion der Durchlichtaufnahmen eines Schnittees nach 48 h *in vitro* zeigt eine deutliche Markierung der VZ der ganglionischen Eminenzen. Außerdem sind in der SVZ von MGE und LGE und in basalen Regionen einzelne Zellen angefärbt. (B), vergrößerte Darstellung des gelb markierten Abschnittes in (A) zeigt die Markierung einzelner Zellen. Balken = 200 µm.

Nun sollte der Einfluss von EphrinA5-Fc in der Ventrikularzone auf die Migration von EGFP-Interneuronen der MGE untersucht werden. Dazu wurde das Transplantationsexperiment entsprechend dem Bindungsassay mit 5 µg/ml EphrinA5-Fc im Medium für 2 Tage *in vitro* durchgeführt. Wie in Abb. 4.2.5.1. A deutlich zu erkennen ist, vermeiden die Neurone die Ventrikularzone mit dem dort vorhandenen EphrinA5-Fc. Die Quantifizierung ergab eine mittlere Fluoreszenzintensität von nur 1,3 % in der Region 1. Ein Großteil der Neurone migriert in der SVZ (Region 2-7) und in tieferen Regionen (Abb. 4.2.5.1. B). In Abbildung 4.2.5.2. ist ein direkter Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der lateralen ganglionischen Eminenz der Kontrollversuche und nach Zugabe von EphrinA5-Fc im Medium dargestellt. Die Intensitätsunterschiede der Region 1 sind signifikant unterschiedlich (*student t-test*). Während in den Kontrollversuchen die Fluoreszenzintensität 100 % beträgt, so ist nach Zugabe von EphrinA5-Fc fast keine Fluoreszenz in der Region 1 nachweisbar, was das die stark reduzierte Anzahl migrierender EGFP-Neurone in der Ventrikularzone repräsentiert. Weiterhin konnten signifikante Unterschiede in den Regionen 4-10 nachgewiesen werden (Abb. 4.2.4.3.; *student t-test*). Liegt die relative Fluoreszenzintensität der Kontrollversuche im Mittel bei 30 % (Region 4-6) oder weniger (7-10), so liegt die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Regionen nach EphrinA5-Fc Applikation bei über 60 %, was die ventrale Verschiebung des Migrationsmusters repräsentiert.

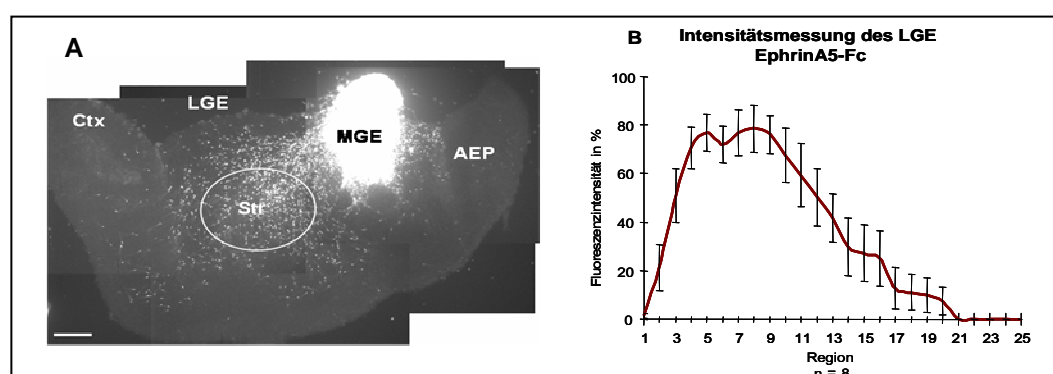


Abb. 4.2.5.1.: Tangential migrierende Neurone aus einem homotypisch transplantiertem Explantat aus der MGE von EGFP-Embryonen auf einem Wildtyp Schnitt nach 2 Tagen *in vitro* vermeiden nach Zugabe von rekombinantem EphrinA5-Fc

die Ventrikularzone und migrieren ungeordnet in der Subventrikularzone der LGE und in tieferen Regionen. (A), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen eines coronalen Wildtyp-Schnittes (E14) mit einem EGFP Explantat der MGE mit EphrinA5-Fc im Medium nach 2 Tagen *in vitro*. (B), normierte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE. Balken = 200 µm; n = Anzahl ausgewerteter Schnitte. AEP = Area Entopeduncular; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage.

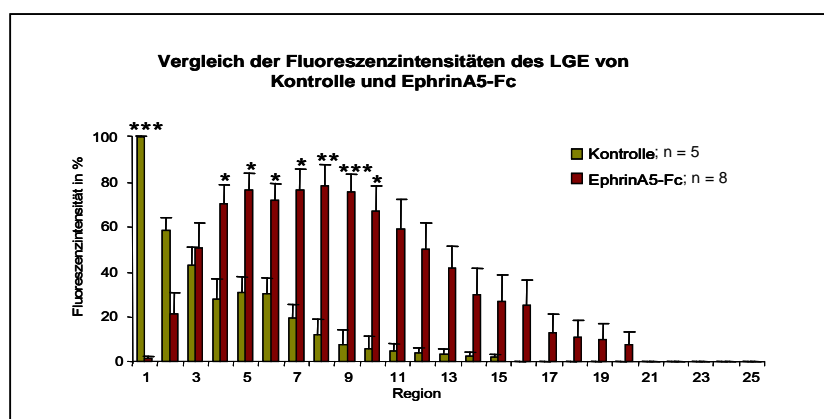


Abb. 4.2.5.2.: Vergleich der normierten Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 nach Zugabe von EphrinA5-Fc mit der Kontrolle. Die Fluoreszenzintensität der Region 1 ist nach Zugabe von EphrinA5-Fc im Medium signifikant reduziert. In den Regionen 4 bis 10 sind die Fluoreszenzintensitäten nach EphrinA5-Fc Zugabe wiederum signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle.

Time-lapse Aufnahmen migrierender EGFP-MGE Neurone auf coronalen Schnitten unterstützen diese Ergebnisse. Die Abbildung 4.2.5.3. zeigt Ausschnitte aus Time-lapse Sequenzen aus einem Kontrollversuch (Abb. 4.2.5.3. A; linke Spalte) und nach Zugabe von 5 µg/ml EphrinA5-Fc (Abb. 4.2.5.3. B; rechte Spalte). In den oberen Skizzen sind jeweils die Lokalisationen der gescannten Bereiche in den coronalen Schnitten dargestellt. Die Aufnahmen beginnen nach 24 h *in vitro* (Start). Im Zusatzmaterial sind die Originalaufnahmen auf CD enthalten (Abschnitt 8.3., Film 7 und 8). Im Kontrollversuch ist zu erkennen, dass die EGFP-Neurone entlang der Ventrikularzone und Subventrikularzone in der LGE migrieren (Abb. 4.2.5.3. A). Die Ventrikularzone der LGE wird nach EphrinA5-Fc Zugabe (Abb. 4.2.5.3. B) hingegen deutlich vermieden. Bereits kurz nach dem Auswandern der Neurone aus dem Explantat in der MGE, migrieren die Zellen in der Subventrikularzone und in tieferen Regionen.

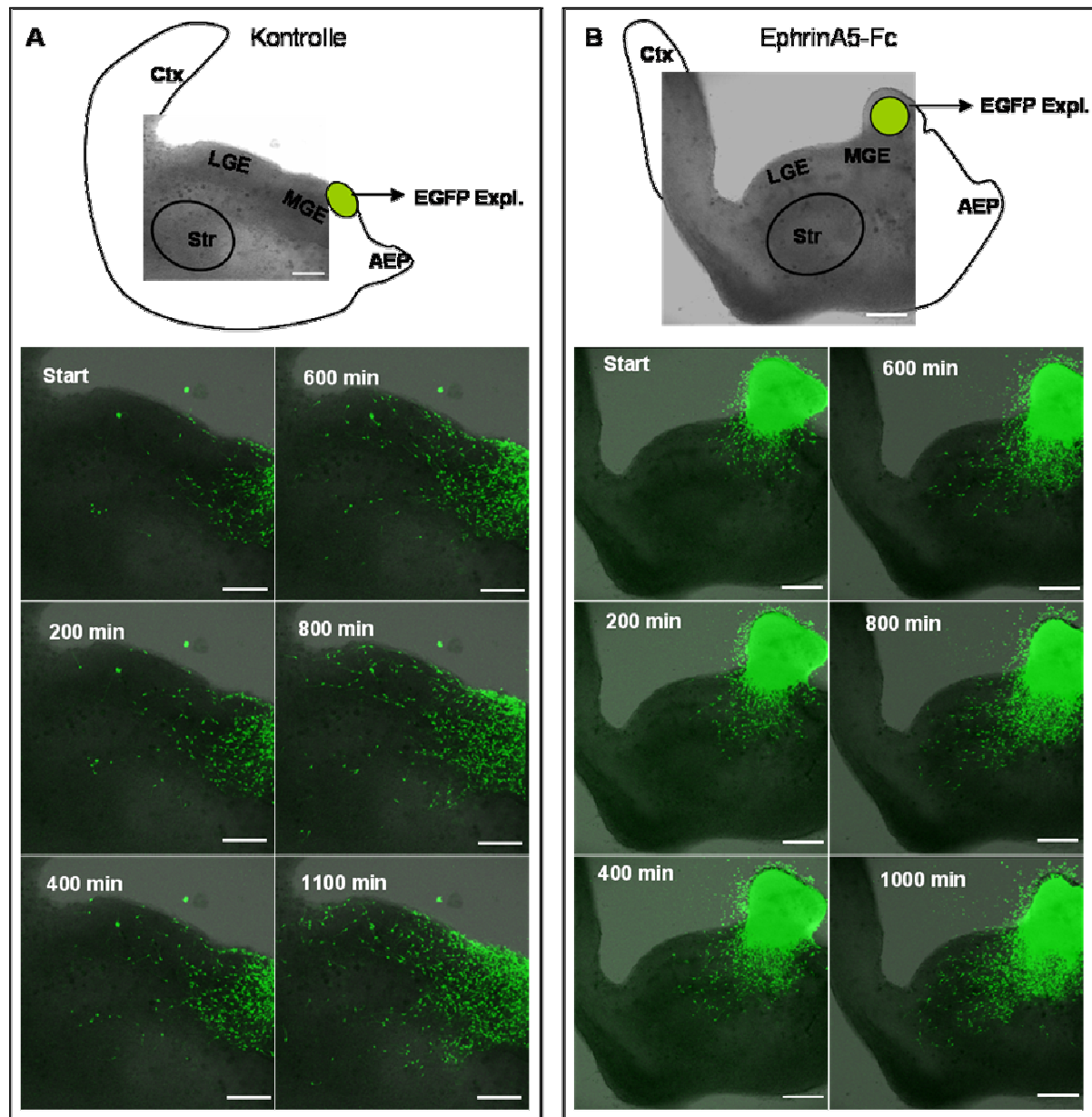


Abb. 4.2.5.3.: Time-Lapse Aufnahmen von migrierenden EGFP-MGE Neuronen auf Wildtyp-Schnitten *in vitro*. Die Aufnahmen beginnen nach 24 h *in vitro*. Die oberen Skizzen zeigen die Lokalisationen der Aufnahmebereiche in den coronalen Schnitten. (A), im Kontrollversuch migrieren die EGFP-Neurone entlang der VZ und SVZ in der LGE. (B), Nach Zugabe von EphrinA5-Fc vermeiden die EGFP-Neurone die VZ. AEP = Area Entopeduncularis; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage. Balken = 200 μ m.

In Abb. 4.2.5.4. sind Ausschnitte der Ventrikularzone lateral der Explantate aus den in Abb. 4.2.5.3. dargestellten Time-lapse Sequenzen vergrößert abgebildet. Das weiße Rechteck in den jeweils oberen Skizzen in Abb. 4.2.5.4. markiert die vergrößert dargestellte Region im Schnitt. Im Kontrollversuch (Abb. 4.2.5.4. A, linke Spalte) ist eine dichte Migration der Zellen in der Ventrikularzone zu erkennen. Nach EphrinA5-Fc Zugabe (Abb. 4.2.5.4. B, rechte Spalte) verlassen die EGFP Neurone schon unmittelbar nach dem Austreten aus dem Explantat die Ventrikularzone des Wildtyp-Schnittes. Der weiße Pfeil markiert eine Zelle, die nach Auswandern aus dem Explantat in der

Ventrikularzone des Wildtyp-Schnittes migriert, dann nach ventral in die Subventrikularzone wandert und dabei eine Bifurkation ihres *leading*-Fortsatzes aufweist. Eine Bifurkation wurde bereits bei migrierenden kortikalen Interneuronen beobachtet, sobald diese die Intermediärzone des Kortex erreichen, was als aktives Suchen nach Signalmolekülen interpretiert wurde (Nadarajah et al., 2003). Diese Aufnahmen deuten darauf hin, dass die auswandernden Neurone auf ein repulsives Signal in der Ventrikularzone nach EphrinA5-Fc Zugabe reagieren.

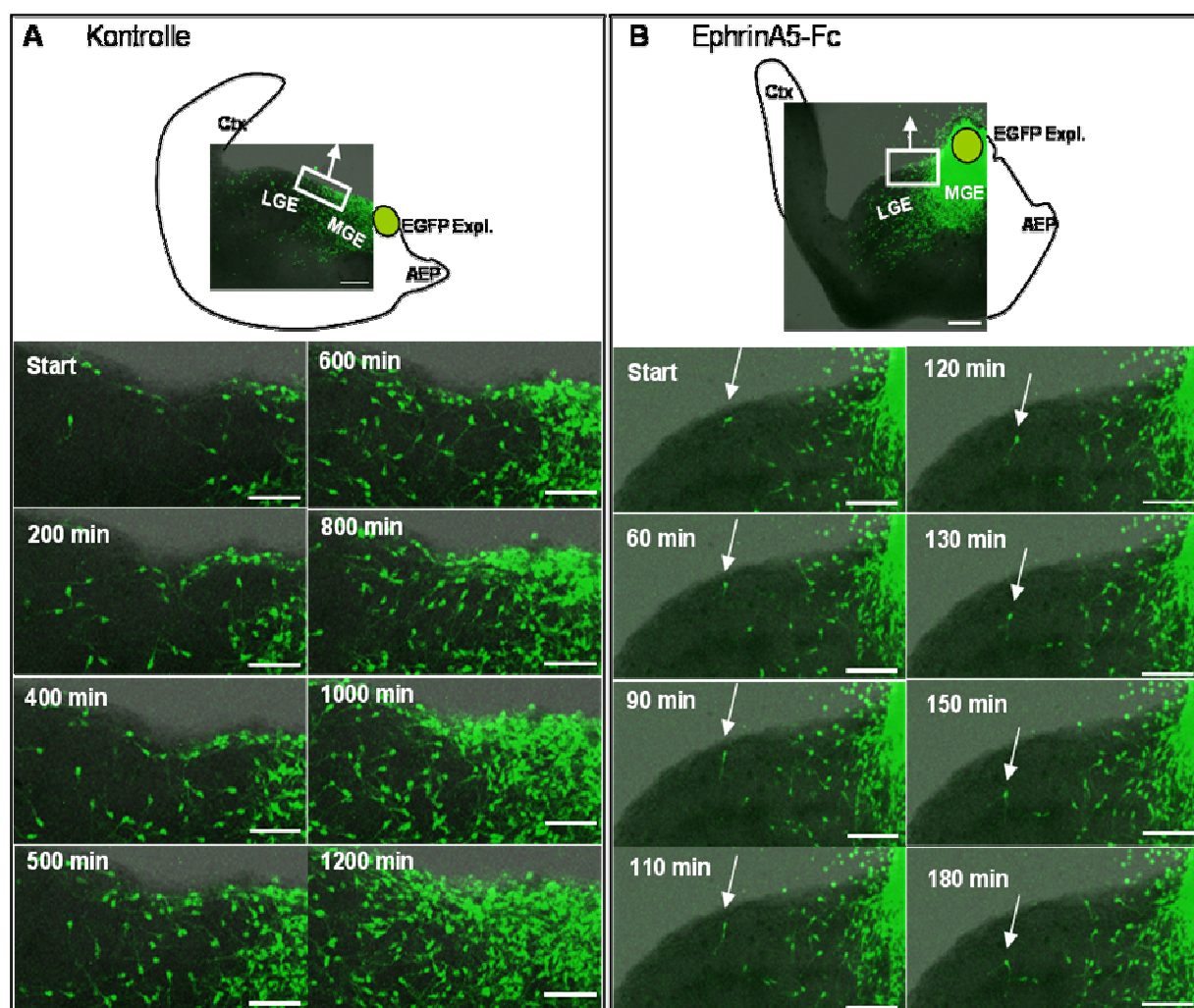


Abb. 4.2.5.4.: Vergrößerte Darstellung der Ventrikularzonen lateral der Explantate aus Time-Lapse Aufnahmen von migrierenden EGFP-Neuronen auf Wildtyp-Slices *in vitro* aus 4.2.5.3.. In den oberen Skizzen ist die Lokalisation der dargestellten Vergrößerungen im Schnitt mit einem weißen Rechteck markiert. Beginn der Aufnahmen ist nach 24 h *in vitro*. (A), im Kontrollversuch zeigen die EGFP-Neurone eine dichte Migration entlang der VZ. (B), Nach Zugabe von EphrinA5-Fc vermeiden die EGFP-Neurone die VZ bereits kurz nach Austreten aus dem Explantat. Der weiße Pfeil markiert eine Zelle, die nach Bifurkation des leading-Fortsatzes einen Richtungswechsel aus der VZ heraus aufweist. AEP = Area Entopeduncularis; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage. Balken = 50 μ m.

Die dargestellten Versuche konnten zeigen, dass exogenes oligomeres EphrinA5-Fc hauptsächlich an die Zellen der Ventrikularzone bindet und dass die migrierenden EGFP-MGE Neurone infolgedessen

diese Region vermeiden. Dieser Effekt scheint darauf zu basieren, dass ein Teil der gebundenen oligomeren oder multimeren EphrinA5-Fc Moleküle an die Rezeptoren der Ventrikularzone binden, die gebundenen EphrinA5-Fc Cluster aber zusätzlich noch über freie Bindungsstellen verfügen, die die Rezeptoren der migrierenden Neurone aktivieren und somit eine repulsive Wirkung auf die MGE-EGFP Neurone haben könnten. Laut Datenblatt liegt das rekombinante Protein aufgrund von Disulfidbrückenbindungen der Fc-Teile als Dimer vor. Darüberhinaus wurde allerdings beschrieben, dass die extrazelluläre Domänen der Ephrine homophile Interaktionstellen besitzen, wodurch das rekombinante EphrinA5-Fc einen noch höheren Grad der Clusterung erreichen kann (Davis et al., 1994; Himanen et al., 2003). Vorversuche mit geclusterem EphrinA5-Fc unter Verwendung eines anti-IgG Antikörpers ergaben das gleiche Migrationsmuster wie nach Zugabe von EphrinA5-Fc (Daten nicht gezeigt), weshalb alle weiteren Versuche ohne zusätzliche Clusterung durch einen Antikörper durchgeführt wurden. Diese Beobachtungen stimmen mit der Annahme überein, dass das rekombinante EphrinA5-Fc als Multimer vorliegt.

4.2.6. Das Vermeiden der Ventrikularzone nach EphrinA5 Zugabe *in vitro* ist abhängig vom Grad der Clusterung

Um eine Abhängigkeit des Vermeidens der Ventrikularzone der MGE-Neurone vom Grad der Clusterung des EphrinA5-Fc Proteins zu untersuchen, wurde die IgG-Sequenz von der extrazellulären EphrinA5-Domäne unter Verwendung des Coagulationsfaktor Xa abgespalten. Die abgespaltenen EphrinA5-Domänen könnten somit lediglich über homophile Interaktionen Dimere ausbilden (Davis et al., 1994; Himanen et al., 2003). Der Coagulationsfaktor Xa spaltet nur eine spezifische Peptidsequenz, die als Peptidlinker ausschließlich zwischen der extrazellulären Domäne von EphrinA5 und dem Fc-Teil vorlag. Die Fc-Abspaltung wurde mit SDS-PAGE kontrolliert und ergab wie erwartet nur zwei Spaltprodukte für EphrinA5 und den IgG-Teil (siehe Material und Methoden). Da unter Verwendung der äußerst sensitiven Silberfärbung neben den beiden Spaltprodukten keine weiteren Degradationen im Proteingel sichtbar waren, kann man davon ausgehen, dass die Rezeptorbindestelle der extrazellulären EphrinA5 Domäne intakt geblieben ist. Demzufolge sollte das EphrinA5-Spaltprodukt im Schnitt an die gleichen Regionen binden, wie das rekombinante EphrinA5-Fc Ausgangsprodukt. Ein immunhistochemischer Nachweis der Bindungsstellen des EphrinA5-Spaltproduktes war leider nicht möglich, da kein funktionierender Antikörper für humanes EphrinA5 erhältlich war.

Die Behandlung coronaler Schnitte mit 5 µg/ml der Spaltprodukte des verdauten EphrinA5-Fc im Medium führte dazu, dass die meisten Neurone nach 2 Tagen *in vitro* ähnlich den Kontrollversuchen wieder in der Ventrikularzone migrierten (Abb. 4.2.6. A und B). Die Fluoreszenzintensität der Region 1 betrug fast 90 %. In Abbildung 4.2.6.1. ist ein direkter Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Kontrolle und nach Zugabe des verdauten EphrinA5-Fc dargestellt. Die normierte Fluoreszenzintensität in der Region 1 erreicht fast wieder das Kontrollniveau. Vergleicht

man die Fluoreszenzintensitäten der migrierenden Zellen nach Zugabe des gespaltenen EphrinA5-Fc Proteins mit den Fluoreszenzintensitäten nach Behandlung mit dem rekombinanten EphrinA5-Fc Ausgangsprodukt (Abb. 4.2.6.2.), so liegt der wesentliche Unterschied im Vermeiden der Ventrikularzone. Somit kann mit geringer geclustertem EphrinA5 die *in vivo* Situation bezüglich des Freilassens der Ventrikularzone nicht rekonstruiert werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund des geringeren Grades der Clusterung weniger EphrinA5-Moleküle mit den EphrinA5-Domänen assoziiert sind, die an die Rezeptoren der Ventrikularzone binden und somit weniger freie EphrinA5-Epitope für die Aktivierung der Rezeptoren der migrierenden Zellen in dieser Region vorhanden sind. Der geringere Grad der Clusterung führt außerdem dazu, dass bei gleicher Ausgangskonzentration die Konzentration von freiem, nicht in der Ventrikularzone gebundenem EphrinA5 erhöht wird, da weniger Moleküle mit den EphrinA5-Fc Moleküle assoziiert sind, die mit den Rezeptoren der Ventrikularzone interagieren. Die gesteigerte Konzentration von freiem EphrinA5 könnte wiederum dazu führen, dass vermehrt EphrinA5 an die Rezeptoren der migrierenden Zellen binden und diese absättigen bzw. blockieren könnte.

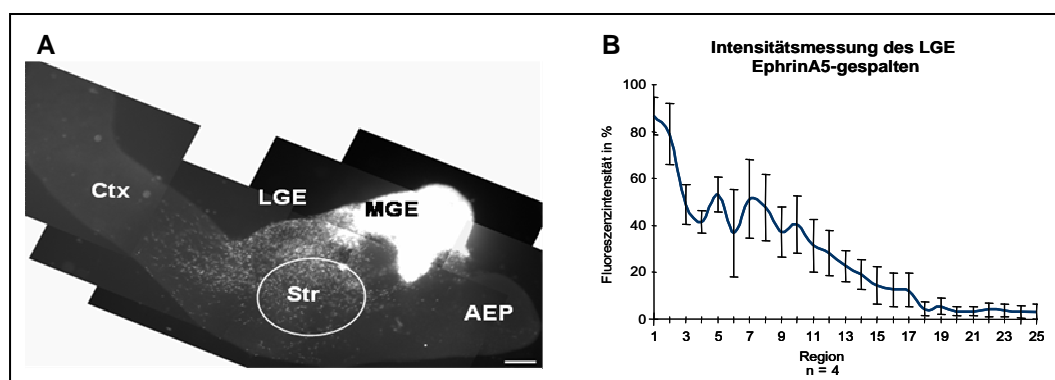


Abb. 4.2.6.: Tangential migrierende Neurone aus einem homotypisch transplantiertem Explantat aus dem MGE von EGFP-Embryonen auf einem Wildtyp-Schnitt nach 2 Tagen *in vitro* nach Zugabe der Spaltprodukte von EphrinA5-Fc. Das durch EphrinA5-Fc induzierte Vermeiden der VZ kann nicht durch geringer geclustertes EphrinA5 erreicht werden, die Neurone wandern ähnlich der Kontrolle auch in der VZ. (A), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen eines coronalen Wildtyp-Schnittes (E14) mit einem EGFP Explantat der MGE mit verdautem EphrinA5-Fc im Medium nach 2 Tagen *in vitro*. (B), normierte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 des LGE. AEP = Area Entopedunculare; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage. Balken = 200 µm; n = Anzahl ausgewerteter Schnitte.

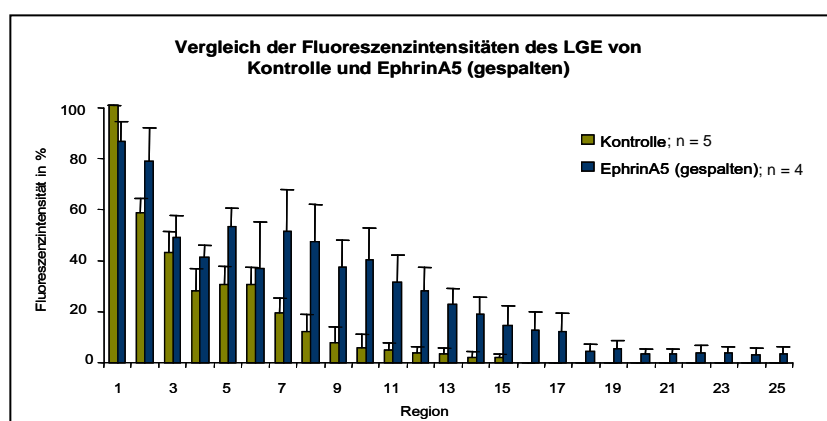


Abb. 4.2.6.1.: Vergleich der normierten Quantifizierungen der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE nach Zugabe der Spaltprodukte von EphrinA5-Fc nach Behandlung mit dem Coagulationsfaktor Xa mit der Kontrolle. Die Fluoreszenzintensität der Region 1 erreicht nach Zugabe von gespaltenem EphrinA5-Fc nahezu das Kontrollniveau.

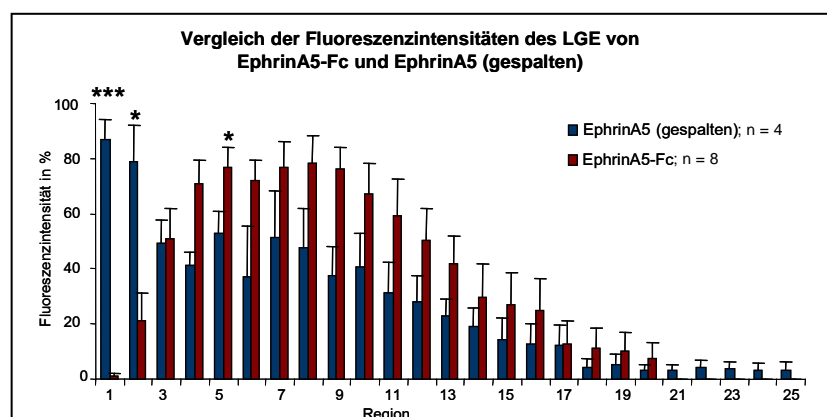


Abb. 4.2.6.2.: Vergleich der normierten Quantifizierungen der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE nach Zugabe des verdauten EphrinA5-Fc Proteins mit den Fluoreszenzintensitäten nach Zugabe des rekombinanten EphrinA5-Fc Ausgangsproduktes. Die signifikant reduzierte Fluoreszenzintensität der Region 1 konnte nur nach Zugabe von EphrinA5-Fc beobachtet werden.

4.2.7. Das EphA-vermittelte Vermeiden der VZ der LGE *in vitro* ist abhängig von der Aktivität der SFKs

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Rekonstruktion der *in vivo* Situation durch Zugabe von EphrinA5-Fc von dessen Grad der Clusterung abhängig ist. Als nächstes sollte der Signaltransduktionsweg näher charakterisiert werden, der die EphA-vermittelte Repulsion der migrierenden MGE-Neurone aus der Ventrikularzone bewirkt. Dazu wurde, in Anlehnung an die Untersuchungen der Effekte von EphrinA5 auf kortikale Neurone, der SFK-Inhibitor PP2 im Transplantationsexperiment eingesetzt, um die SFK-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung der EphA Rezeptoren pharmakologisch zu blockieren. Da bekannt ist, dass SFKs in die Migration von Zellen involviert sind (Klinghoffer et al., 1999), sollte zunächst der Effekt von PP2 unabhängig von EphrinA5-Fc auf die tangentielle Migration der MGE-EGFP Neurone *in vitro* als ein Kontrollexperiment untersucht werden. Dazu wurden die Schnitte für 2 Tage mit 5 μ M PP2 im Medium kultiviert. Wie in den Abbildungen 4.2.7. und 4.2.7.1. dargestellt, migrieren die Neurone nach Blockierung der SFKs ähnlich wie in der Kontrolle in der VZ und SVZ. Die Fluoreszenzintensität der Region 1 liegt bei über 90 %. Es konnte lediglich eine leichte Ausdehnung des Migrationsmusters in tiefere Regionen der LGE beobachtet werden, die statistisch jedoch nicht signifikant war (Abb. 4.2.7.1.). Somit führt die Blockierung der SFKs durch die Behandlung mit 5 μ M PP2 nicht zu einer signifikanten Veränderung des Migrationsverhaltens der EGFP-MGE Neurone *in vitro*.

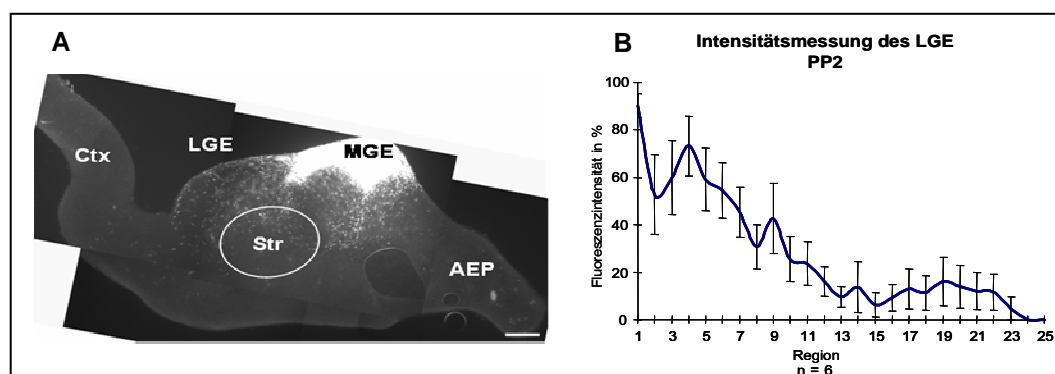


Abb. 4.2.7.: Tangential migrierende Neurone aus einem homotypisch transplantiertem Explantat aus der MGE von EGFP-Embryonen auf einem Wildtyp Schnitt nach 2 Tagen *in vitro* nach Zugabe von PP2. Die Zellen wandern in der VZ und SVZ. (A), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen eines coronalen Wildtyp-Schnittes (E14) mit einem EGFP Explantat der MGE mit PP2 im Medium nach 2 Tagen *in vitro*. (B), normierte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE. AEP = Area Entopedunculare; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage. Balken = 200 μ m; n = Anzahl ausgewerteter Schnitte.

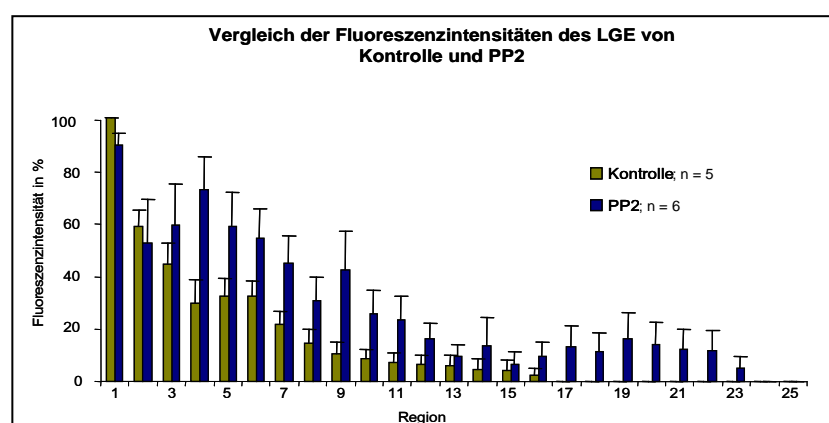


Abb. 4.2.7.1.: Vergleich der normierten Quantifizierungen der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE nach Zugabe von PP2 mit der Kontrolle.

Um die SFK-Abhängigkeit der EphrinA5-Fc induzierten Repulsion der kortikalen Interneurone aus der Ventrikularzone der coronalen Schnitten *in vitro* zu untersuchen, wurde EphrinA5-Fc zusammen mit 5 μ M PP2 für 2 Tage in das Medium appliziert. Das Ergebnis der Migration der MGE-Neurone ist in Abb. 4.2.7.2. dargestellt. Durch die Blockierung der SFK-Aktivität kann EphrinA5-Fc keine Repulsion der migrierenden Zellen aus der Ventrikularzone mehr auslösen. Die Migration der Neurone dehnte sich zwar in alle Regionen der LGE aus, jedoch wurde die höchste Fluoreszenzintensität von über 80 % in der Region 1 gemessen werden (Abb. 4.2.7.2. B; Abb. 4.2.7.4. A). Um das Einwandern der Neurone in die Ventrikularzone der LGE nach Zugabe von EphrinA5-Fc zusammen mit PP2 noch deutlicher darzustellen, wurde nach 2 Tagen *in vitro* eine Immunfärbung mit einem anti-Mensch IgG-Alexa568 Antikörper durchgeführt, der die Bindungsstelle von EphrinA5-Fc in der Ventrikularzone markiert (Abb.4.2.7.3.). Das weiße Kästchen in Abb. 4.2.7.3. A markiert den in

Abb. 4.2.7.3. B heraus vergrößerten Bereich, in dem die Bindungsstelle des EphrinA5-Fc mit rot markiert, und die EGFP-Neurone in grün überlagert dargestellt sind. Der direkte Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach Zugabe von EphrinA5-Fc mit PP2 mit der Kontrolle zeigt darüber hinaus deutlich, dass sich die Fluoreszenzintensitäten in den Regionen 1 bis 5 kaum unterscheiden Abb. 4.2.7.4. A). Somit ist das EphA-vermittelte Vermeiden der Ventrikularzone nach EphrinA5-Fc Applikation abhängig von der Aktivität der SFKs.

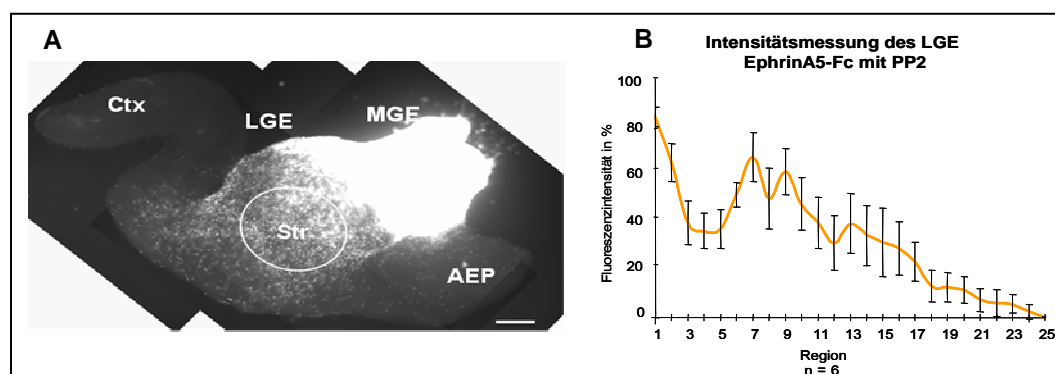


Abb. 4.2.7.2.: Tangential migrierende Neurone aus einem homotypisch transplantiertem Explantat aus der MGE von EGFP-Embryonen auf einem Wildtyp Schnitt nach 2 Tagen *in vitro* nach Zugabe von EphrinA5-Fc zusammen mit PP2. Nach SFK-Inhibition migrieren die Neurone wieder in der VZ. (A), Rekonstruktion von Fluoreszenzaufnahmen eines coronalen Wildtyp-Schnittes (E14) mit einem EGFP Explantat der MGE mit EphrinA5-Fc und PP2 im Medium nach 2 Tagen *in vitro*. (B), normierte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE. AEP = Area Entopeduncularis; MGE = mediale ganglionische Eminenz; LGE = laterale ganglionische Eminenz; Ctx = Kortex; Str = striatale Anlage. Balken = 200 µm; n = Anzahl ausgewerteter Schnitte.

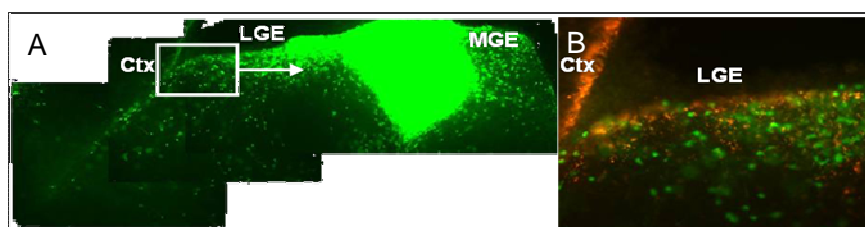


Abb. 4.2.7.3.: (A), Tangential migrierende Neurone aus einem homotypisch transplantiertem Explantat aus dem MGE von EGFP-Embryonen auf einem Wildtyp Schnitt nach 2 Tagen *in vitro* nach Zugabe von EphrinA5-Fc zusammen mit PP2. Das weiße Kästchen markiert den in (B) heraus vergrößerten Bereich, in dem zusätzlich eine Immunmarkierung gegen den Fc-Teil des rekombinanten EphrinA5-Fc gezeigt ist (rot).

In Abb. 4.2.7.4. B sind die Fluoreszenzintensitäten nach Zugabe von EphrinA5-Fc und nach Applikation von EphrinA5-Fc zusammen mit PP2 im Vergleich dargestellt. Die Fluoreszenzintensitäten der Region 1 und 2 zeigen eine signifikante Steigerung nach Inhibition der SFKs, was verdeutlicht, dass die durch EphrinA5 ausgelöste Repulsion über SFKs vermittelt wird. Vergleicht man die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der LGE nach Zugabe von EphrinA5-Fc, dass zuvor mit dem Coagulationsfaktor Xa gespalten wurde mit den Daten, die nach Behandlung mit EphrinA5-Fc

zusammen mit PP2 erhalten wurden, so stimmen diese weitestgehend überein (Abb. 4.2.7.4. C). In beiden Fällen konnte die höchste Fluoreszenzintensität in der Ventrikularzone gemessen werden.

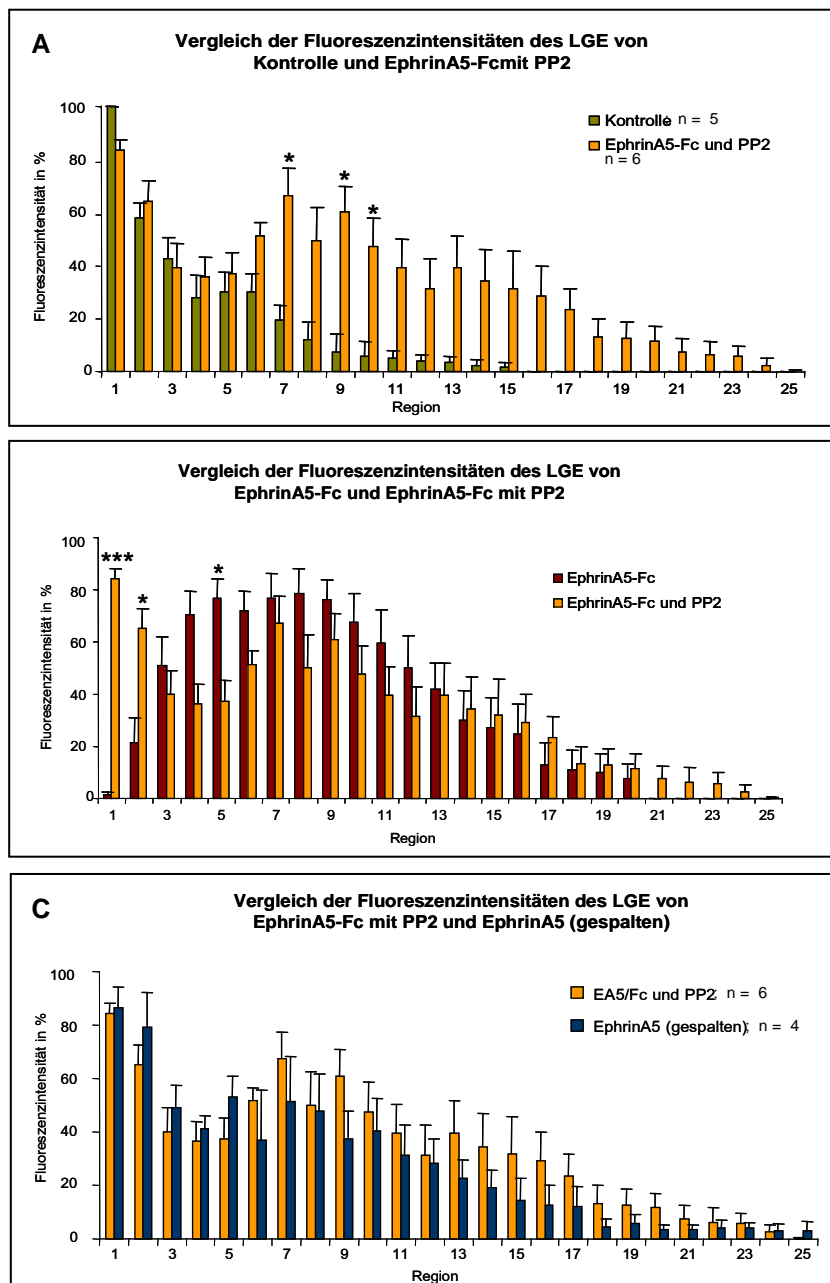


Abb. 4.2.7.4. A-C: Vergleich der normierten Quantifizierungen der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 1 bis 25 der LGE nach (A), Zugabe von EphrinA5-Fc und PP2 mit der Kontrolle; (B), Zugabe von EphrinA5-Fc mit den Fluoreszenzintensitäten nach Applikation von EphrinA5-Fc mit PP2 und (C), nach Zugabe von EphrinA5 nach Abspaltung des Fc-Teiles mit den Fluoreszenzintensitäten nach Applikation von EphrinA5-Fc mit PP2.

Eine Zusammenfassung der Migrationsmuster unter den verschiedenen Bedingungen ist in Abb. 4.2.7.7. dargestellt. Die Zugabe von rekombinantem EphrinA5-Fc resultierte in einer starken Bindung des Proteins in der Ventrikularzone. Dies führte zum Vermeiden der Ventrikularzone durch migrierende kortikale Interneurone, was sich quantitativ mit einer signifikanten Reduzierung der Fluoreszenzintensität der Region 1 beschreiben lässt (Abb. 4.2.7.7. A und B). Die Repulsion der Neurone aus der Ventrikularzone entspricht der *in vivo* Situation, die sich außerdem durch eine Expression von EphrinA5 in der Ventrikularzone auszeichnet. Somit kann die *in vivo* Situation durch Zugabe von EphrinA5-Fc rekonstruiert werden, wobei der Grad der Clusterung des Proteins entscheidend ist. Die Behandlung mit gering geclustertem EphrinA5 durch Abspaltung der Fc-Sequenz führt nicht zum Vermeiden in der Ventrikularzone durch EGFP-MGE Neurone *in vitro*. Die vorliegenden Daten deuten des Weiteren darauf hin, dass die EphrinA5-Fc induzierte Repulsion der kortikalen Interneurone aus der Ventrikularzone über SFKs vermittelt wird.

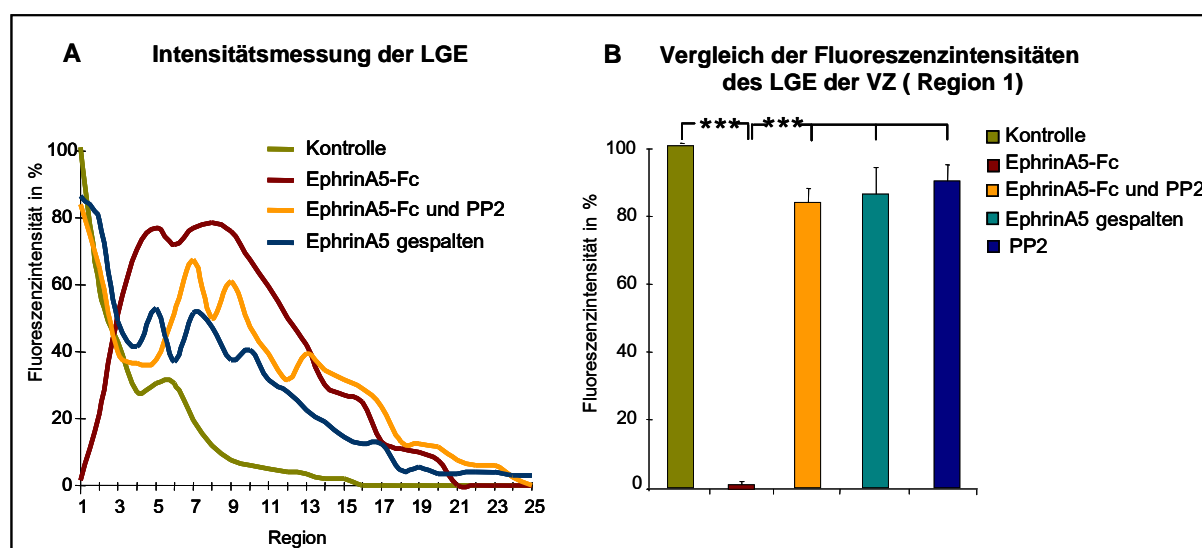


Abb. 4.2.7.7.: (A), Zusammenfassung der Quantifizierungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der LGE unter den verschiedenen Bedingungen. (B), Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Region 1.

4.2.8. Die Rolle des Eph/Ephrin System bei der Vermeidung der striatalen Anlage

Eine entscheidende Übereinstimmung der Migration im *in vitro*-Modell mit der tangentialen Migration *in vivo* besteht darin, dass die kortikalen Interneurone unter Kontrollbedingungen nicht in die Region der striatalen Anlage einwandern. Bisher ist bekannt, dass das Semaphorin/Neuropilin System bei der Vermeidung der striatalen Anlage durch kortikale Interneurone beteiligt ist (Marin et al., 2001b). Da nach Zugabe von EphrinA5-Fc (Abb. 4.2.5.1.; Abb. 4.2.5.2.) als auch EphrinA5-Fc zusammen mit PP2 (Abb. 4.2.7.2.; Abb. 4.2.7.4.; Abb. 4.2.7.5.) eine deutliche Ausdehnung der migrierenden Zellen in tiefere Regionen und somit auch in die striatale Anlage zu verzeichnen ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch das Eph/Ephrin Systems an der Begrenzung permissiver Korridore für kortikale

Interneurone bezüglich der Vermeidung der striatalen Anlage beteiligt ist. Um das Einwandern der Zellen in die striatale Anlage quantitativ zu erfassen, wurden die Fluoreszenzintensitäten der Regionen 8 bis 13 zusammengefasst und statistisch verglichen, was eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten nach EphrinA5-Fc Applikation und nach Zugabe von EphrinA5-Fc mit PP2 gegenüber der Kontrolle ergab (Abb. 4.2.8.). Da nach Inaktivierung der SFKs bei gleichzeitiger Zugabe von EphrinA5-Fc der gleiche Effekt bei der veränderten Migration in die striatale Anlage erzielt wurde wie nach Zugabe von EphrinA5-Fc ohne Inhibitor, so scheint dass durch EphrinA5-Fc induzierte Einwandern der kortikalen Neurone nicht auf eine SFK-vermittelte Aktivierung endogener Eph-Rezeptoren zurückzuführen sein.

Die Behandlung der Kulturen mit enzymatisch gespaltenem EphrinA5-Fc resultierten, ähnlich wie nach Zugabe von PP2, im Vergleich mit der Kontrolle in einem Trend zur Ausdehnung der Migration in tiefere Regionen, die aber sowohl in den Einzelvergleichen (Abb. 4.2.6., Abb. 4.2.6.1., Abb. 4.2.7., Abb. 4.2.7.1.) als auch nach Zusammenfassung der Fluoreszenzintensitäten der Regionen 8 bis 13 (Abb. 4.2.7.) keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle zeigten. Dies könnte auf die geringere Anzahl durchgeführter Experimente und des damit verbundenen erhöhten Standardfehlers zurückzuführen sein. Ergänzende und weiterführende Experimente sind erforderlich, um den Einfluß des Eph/Ephrin-Systems bei der Begrenzung permissiver Korridore im basalen Telencephalon und zugrunde liegende Mechanismus herauszustellen.

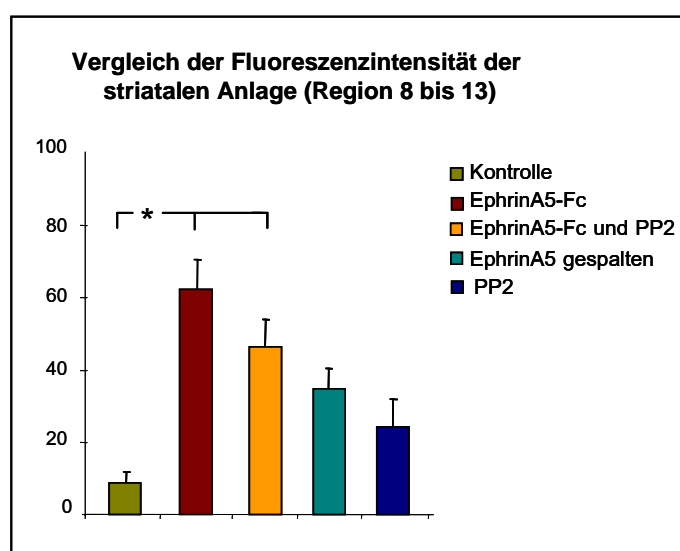


Abb. 4.2.8.: Zusammenfassung der Quantifizierungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in der striatalen Anlage (Regionen 8 bis 13) unter den verschiedenen Bedingungen *in vitro*.

5. Diskussion

In der Literatur wurde EphrinA5 als ein Signalmolekül beschrieben, welches hauptsächlich durch repulsive Interaktionen an der Regulation von unterschiedlichen Entwicklungsvorgängen im Nervensystem beteiligt ist (Flanagan et al., 1998; Kullander et al., 2002; Klein, 2004; Knoll et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von EphrinA5 auf die kortikale Entwicklung und auf die Migration kortikaler Interneurone der MGE näher untersucht. Im ersten Projekt wurde gezeigt, dass EphrinA5 verschiedene Effekte auf embryonale kortikale Neurone *in vitro* haben kann. Als homogenes Substrat steigert EphrinA5 SFK-abhängig die Motilität und Aggregation der Neurone. Die wichtige Rolle der SFKs im *downstream signaling* der EphA-Rezeptoren wird besonders im Streifenassay deutlich, bei dem die EphrinA5 ausgelöste Repulsion nach Inhibierung der SFK-Aktivität in Adhäsion konvertiert wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die durch EphrinA5-Fc induzierten repulsiven Effekte von einer Abgabe von Membranpartikeln mit aktivierten EphA-Rezeptoren begleitet werden. Dieses „*membrane-ribbing*“ wird zumindest zum Teil durch SFK vermittelt und stellt einen weiteren Mechanismus dar, um repulsive Interaktionen nach hoch affiner Eph-Rezeptor/Ephrin-Liganden Bindung zu ermöglichen.

Im zweiten Projekt wurde der Einfluss von EphrinA5 auf die tangentielle Migration von EGFP-MGE Neuronen *in vitro* auf coronalen Schnitten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich das Migrationsmuster von MGE-Neuronen sowie das Epressionsmuster einiger Ephrine und Rezeptoren *in vitro* im Vergleich zur *in vivo*-Situation veränderte. EphrinA5 ist *in vivo* in der VZ der MGE und LGE exprimiert, der Region, welche die migrierenden kortikalen Interneurone *in vivo* vermeiden. Nach 48 h *in vitro* ist in dieser Region kein EphrinA5 mehr nachweisbar und die Neurone migrieren in der Ventrikularzone. Durch Applikation von exogenem EphrinA5-Fc konnte die *in vivo* Situation rekonstruiert werden, da EphrinA5-Fc hauptsächlich lokal an die Zellen der Ventrikularzone bindet und zu einer SFK-abhängigen Vermeidung der Ventrikularzone durch kortikale Interneurone führte. Im Streifenassay konnte ebenfalls ein repulsiver Effekt von EphrinA5 auf die Neurone der LGE und MGE beobachtet werden. Überträgt man diese Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation, so legen diese nahe, dass EphrinA5 an dem Auswandern der neugeborenen migrierenden Zellen aus der Ventrikularzone und an der Begrenzung des permissiven Korridors für tangential migrierende kortikale Interneurone beteiligt ist.

5.1. Die Rolle von Ephrinen und Eph-Rezeptoren bei Zell-Zell-Aggregation, Zell-ECM-Interaktionen und Migration

Zelladhäsionsmoleküle sind integrale Membranproteine, die entweder Zell-Zell-Interaktionen (Cadherine, Immunglobulin Superfamilie oder N-CAMs für *nerve cell adhesion molecule*) oder Zell-ECM-Interaktionen (Integrine) durch homophile oder heterophile Bindungen vermitteln. Zell-Zell-Interaktionen, die zum Zusammenschluss von gleichartigen Zellen zu einem Zellverband

führen, bezeichnet man als *Aggregation*. Aggregation wird durch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Cadherine, N-CAMs) vermittelt und bildet die Grundlage für die Ausbildung gleichartiger Gewebe. Als *Adhäsion* wurden in dieser Arbeit die Zell-Substrat-Interaktionen bezeichnet, die wichtig für die Motilität einer Zelle und somit deren Migration ist. Zellmotilität bezeichnet wortwörtlich das Bewegungsvermögen (lat. „motion“: Bewegung), Zellmigration die eigentliche Fortbewegung oder das Wandern von Zellen. Beide Prozesse beruhen auf der gerichteten Aktinpolymerisierung in Bewegungsrichtung und der Aktin-Myosin-Interaktion in Fibrillenbündeln (stress fibers). In der vorliegenden Arbeit wurde der Begriff *Migration* für eine gerichtete Wanderung von Zellen, der Begriff *Motilität* für die Beweglichkeit der Zellen verwendet, die die Grundlage der Migration bildet.

Klassische Studien haben gezeigt, dass sich experimentell vermischte Zellpopulationen durch verschiedene Zelltyp-spezifische Adhäsionsprozesse wieder aussortieren können (Steinberg, 1970; Nose et al., 1988; Friedlander et al., 1989; Godt et al., 1998). Inzwischen wurde in neueren Arbeiten berichtet, dass auch Ephrin-Eph-Interaktionen adhäsive Vorgänge vor allem zwischen nicht-neuronalen Zellen vermitteln können. In Epithelzellen können Eph-Rezeptoren das Zelladhäsionsmolekül L1 phosphorylieren, was an adhäsiven Kontakten zwischen Zellen beteiligt ist (Zisch et al., 1997b). Weiterhin wurde beschrieben, dass Eph/Ephrin Interaktionen bei der Aggregation von Blutplättchen involviert sind. Dabei weist der EphA4 Rezeptor eine Assoziation mit N-CAM-L1 auf, was die Eph-Rezeptor-induzierte gesteigerte Aggregation vermitteln könnte (Prevost et al., 2002). Des Weiteren konnte (Holmberg et al., 2000) zeigen, dass EphrinA5 und drei verschiedene Splicevarianten des EphA7-Rezeptors, von denen 2 Varianten keine Kinasedomäne aufweisen, Zell-Zell-Adhäsion vermitteln und an der Fusion der lateralen Platten zum Neuralrohr beteiligt sind. Somit können Eph/Ephrin Interaktionen direkt, durch fehlende Rezeptorkinasefunktion, oder indirekt, durch Regulation von Zelladhäsionsmolekülen, an der Aggregation von Zellen beteiligt sein.

Bei Aggregationsvorgängen von Zellen, wie sie für kortikale Neurone auf EphrinA5-Fc Substrat beobachtet wurden, müssen nicht nur Zell-Zell-Interaktionen, sondern auch die Zell-Substrat-Interaktionen mit der extrazellulären Matrix (ECM) reguliert werden. Eine wichtige Gruppe von Zelladhäsionsproteinen, die Zell-ECM-Bindungen vermitteln, sind die transmembranalen Integrine, die intrazellulär mit dem Cytoskelett assoziiert sein können (Turner, 2000; Calderwood et al., 2002; Garcia-Alvarez et al., 2003; Parsons, 2003). Integrine können ebenfalls durch Eph/Ephrin-Interaktionen reguliert werden. Dabei ist sowohl eine positive als auch negative Regulation der Integrine diskutiert worden. Eine Förderung oder Verstärkung der Integrin-Funktion wurde für Vertreter des EphrinB-Systems beschrieben. Endotheliale Zellen, die EphB1 exprimieren, wurden auf EphrinB1-Fc beschichtete Nitrozellulose plattiert, was zu einer Integrin-vermittelten erhöhten Zelladhäsion an das Substrat führte (Huynh-Do et al., 1999). Ferner kann EphrinB1 durch EphB1-Fc aktiviert und phosphoryliert werden, was eine Integrin vermittelte Adhäsion von Endothelzellen an das Substrat bewirkt (Huynh-Do et al., 2002). Eine Inhibition der Integrin-Funktion wurde für Vertreter des EphA-Systems beschrieben. EphA2-Aktivierung führt zu einer Konformationsänderung von Integrin in einen inaktiven Zustand, was in einer verminderten Integrin-vermittelten Adhäsion an das Substrat resultiert (Miao et al., 2000).

Dass Integrin-Substrat-Bindungen auch in migratorische Prozesse involviert sind, legt die Vermutung nahe, dass auch Migration durch die Eph/Ephrin-vermittelte Modulation der Integrin-Funktion reguliert werden kann. Die Beteiligung von Eph/Ephrin-Interaktionen bei migratorischen Prozessen ist bereits beschrieben worden. Humane endotheliale Aortazellen exprimieren den EphB1 Rezeptor, der nach EphrinB1-Fc Stimulation die Geschwindigkeit der Zellmigration dieser Zellen erhöht (Nagashima et al., 2002). Ferner wurde gezeigt, dass EphrinA1 die Migration von Kapillar-Endothelzellen beim Rind induziert (Pandey et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass EphrinA5 auch die Motilität kortikaler Neurone erhöht. Dass die EphrinA5-Fc induzierte gesteigerte Motilität kortikaler Neurone eine SFK-Abhängigkeit aufweist, steht in Übereinstimmung mit Literaturangaben, die zeigen, dass SFKs in Migrationsprozesse involviert sind (Klinghoffer et al., 1999). Weiterhin wurde bereits ein Zusammenwirken von Eph-Rezeptoren und SFKs bei Migrationsprozessen beschrieben. Vindis et al., 2003 haben dargelegt, dass die Regulation der Motilität endothelialer Zellen durch EphB1 eine Abhängigkeit von der SFK-Aktivität aufweist. Diese Ergebnisse zeigen, dass Ephrine und Eph-Rezeptoren durch die Modulation von Zell-Zell-Interaktionen und Zell-ECM-Bindungen an entwicklungsbiologischen Prozessen wie Migration und Aggregation beteiligt sein können, die zur Ausbildung spezifischer Gewebe mit entsprechender Funktionalität führen.

5.2. der *Slice-Assay* als Modellsystem zur Untersuchung der tangentialen Migration kortikaler Interneurone

Die entwicklungsabhängige Expression von Eph-Rezeptoren und der Ephrin-Liganden im basalen Telencephalon (Niehage et al., 2005) legt eine Beteiligung des Eph/Ephrin-Systems an der Regulation der tangentialen Migration kortikaler Interneurone nahe, die mit einem *in vitro*-Modellsystem näher untersucht wurde. Der dazu eingesetzte *slice-Assay* ist ein häufig verwendetes Modellsystem zur Untersuchung der tangentialen Migration *in vitro*, mit dem grundlegende Übereinstimmungen mit der Migration *in vivo* reproduziert werden können (Anderson et al., 2001; Marin et al., 2003b). Jedoch führen *in vitro*-Artefakte auch zu Veränderungen der Migration der Neurone, die für die Interpretation der Daten des *slice-Assays* berücksichtigt werden müssen. Sowohl transplantierte EGFP-MGE-Neurone als auch endogene MGE-Neurone der Wildtyp-Schnitte, die mit *cell-tracker*-Farbstoff markiert wurden, weisen ein verändertes Migrationsmuster *in vitro* auf. *In vivo* vermeiden die kortikalen Interneurone die Ventrikularzone, wohingegen die Mehrzahl der migrierenden Zellen *in vitro* in der Ventrikularzone wandert. Eine *in situ*-Hybridisierung gegen Lhx6, ein Transkriptionsfaktor, der von migrierenden kortikalen MGE-Neuronen exprimiert wird, ergab *in vitro* ebenfalls eine Markierung der Ventrikularzone, die *in vivo* und nach kurzer Zeit *in vitro* nicht nachweisbar ist. Dieses veränderte Migrationsmuster *in vitro*, deckt sich mit Literaturangaben, bei denen der *slice-Assay* angewendet wurde (Anderson et al., 2001; Marin et al., 2003b) und könnte auf Veränderungen der Expressionsmuster von Signalmolekülen in den Schnittkulturen, also auf ein *in vitro*-Artefakt, zurückzuführen sein. Daraus folgende Expressionsanalysen einiger EphA-Rezeptoren konnten zeigen, dass der EphA4-Rezeptor, der *in vivo* am stärksten in der SVZ

exprimiert wird, *in vitro* ein zusätzliches Signal in der VZ ergab, was darauf hindeutet, dass der EphA4-Rezeptor von den migrierenden Zellen exprimiert wird. Das Expressionsmuster des EphA3-Rezeptors in der VZ und SVZ bleibt im Wesentlichen gleich. Eine deutliche Änderung war ferner für die EphrinA5-Expression nachweisbar. *In vivo* wird EphrinA5 in der VZ und im AEP exprimiert, wohin gegen EphrinA5 *in vitro* in der VZ nicht mehr detektiert werden konnte. Diese Untersuchungen zeigen, dass der *slice*-Assay als Modellsystem nur bedingt anwendbar ist, da die Expression von Signalmolekülen und die Migration als *in vitro*-Artefakte verändert werden, was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss.

5.3. Repulsive Effekte von EphrinA5

Repulsive Interaktionen von Ephrinen und deren Rezeptoren wurden bereits für eine Vielzahl von Prozessen während der neuronalen Entwicklung beschrieben. Die Ausbildung topographischer Karten (Drescher et al., 1997; Flanagan et al., 1998; Wilkinson, 2000; Knoll et al., 2002), die Entstehung segmentaler Strukturen des Rhombencephalons (Mellitzer et al., 1999; Xu et al., 1999), die Ausbildung kortikothalamischer Projektionen (Gao et al., 1998; Uziel et al., 2002) und die Faszikulation von Axonen, die wichtig für die Entstehung von Fasertrakten ist (Winslow et al., 1995; Orioli et al., 1996), werden durch repulsive Eph/Ephrin-Interaktionen reguliert. Um eine repulsive Wirkung von EphrinA5 auf kortikale Neurone zu untersuchen, wurde der Streifenassay angewendet, der ein präferentielles Wachstum kortikaler Neurone auf den Kontroll-Streifen, und somit ein deutliches Vermeiden der EphrinA5-enthaltenen Streifen *in vitro* ergab. Time-lapse Aufnahmen konnten zeigen, dass sich die Neurone durch Zell-Zell-Interaktionen mit den Neuronen auf dem Kontroll-Streifen oder nach Kontakt mit dem Kontroll-Substrat aus den EphrinA5-Fc in die Kontroll-Streifen bewegten. Somit hat EphrinA5 eine repulsive Wirkung auf kortikale Neurone.

Darüber hinaus konnte auch auf Zellen der MGE und LGE ein repulsiver Effekt von EphrinA5 im Streifenassay nachgewiesen werden. Ferner vermeiden migrierende EGFP-MGE-Interneurone nach EphrinA5-Applikation die Ventrikularzone im *slice*-Assay, was der ursprünglichen Situation *in vivo* gleich kommt. Wie kann die Zugabe von EphrinA5-Fc in das Medium zur lokalen Vermeidung der Ventrikularzone durch die migrierenden MGE-Neurone *in vitro* führen? Ein Bindungsassay ergab, dass exogen zugegebenes EphrinA5-Fc am stärksten an Zellen der Ventrikularzone bindet. EphA3 könnte dabei ein Bindungspartner für EphrinA5-Fc darstellen, da EphA3 *in vitro* in der Ventrikularzone exprimiert ist. Ältere Bindungsstudien haben außerdem gezeigt, dass EphrinA5 mit einer hohen Affinität an den EphA3 Rezeptor bindet, die 4,4-fach höher ist, als die Affinität zu EphA4 oder EphA5 (Monschau et al., 1997; Flanagan et al., 1998). Die Veränderung der EphA4-Expression *in vitro*, die mit dem veränderten Migrationsmuster der MGE-Neurone korreliert, lässt den Schluss zu, dass der EphA4-Rezeptor von den migrierenden MGE-Neuronen exprimiert wird. Die geringere Affinität von EphrinA5 zu EphA4 im Vergleich zu EphA3 könnte erklären, warum nach EphrinA5-Fc Zugabe die migrierenden Zellen noch freie Rezeptoren zur Erkennung des repulsiven Signals in der Ventrikularzone zur Verfügung haben. Wie kann EphrinA5-Fc jedoch nach Bindung an die

EphA-Rezeptoren in der Ventrikularzone als repulsives Signal für die migrierenden Zellen fungieren? Laut Datenblatt soll das rekombinante EphrinA5-Fc als Heterodimer vorliegen, was durch die Disulfidbrückenbindungen der Fc-Teile vermittelt wird. Das EphrinA5 bereits als Dimer wirksam sein kann, wurde in der Literatur bereits beschrieben (Caras, 1997). Allerdings deutet einiges darauf hin, dass EphrinA5-Fc bereits als Oligomer vorliegt. Experimente, bei denen das rekombinante Protein mit einem Antikörper geclustert zugegeben wurde, ergaben den gleichen Vermeidungseffekt der VZ wie nach Zugabe des ungeclusterten EphrinA5-Fc (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zur Dimerisierung über den Fc-Teil des rekombinanten Proteins können die extrazellulären Domänen von EphrinA5 durch homophile Interaktionen Oligomere ausbilden. Es wurde für die extrazelluläre Domäne der Ephrin-Liganden bereits eine homophile Interaktionsstelle beschrieben, deren schwache Wechselwirkung wahrscheinlich konzentrationsabhängig erhöht wird (Himanen et al., 2003). Davis et al. (1994) haben schon gezeigt, dass EphrinA1 bei 1 µg/ml bereits Dimere ausbildet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 5-fach höhere Konzentration von EphrinA5-Fc eingesetzt, wodurch eine stärkere Clusterung sehr wahrscheinlich ist. Dies könnte erklären, warum EphrinA5-Fc nach Bindung an Rezeptoren der Ventrikularzone einen repulsiven Effekt auf die migrierenden Zellen hat, da durch Bindung von Teilen der Oligomere noch freie EphrinA5-Domänen vorhanden sein könnten, die an die Rezeptoren der migrierenden Zellen binden und diese aktivieren könnten. Um dies zu überprüfen, wurden *slice-Assay*-Experimente durchgeführt, bei denen EphrinA5-Moleküle zugegeben wurde, von denen der Fc-Teil vorher enzymatisch abgespalten wurde und die demnach nicht mehr als Oligomer vorliegen. Diese Versuche resultierten nicht in dem Vermeidungseffekt der Ventrikularzone durch MGE-Neurone. Darüber hinaus führte eine Inhibition von SFKs ebenfalls dazu, dass die Neurone wieder in der Ventrikularzone migrieren, was den Schluss zulässt, dass das EphrinA5 induzierte Vermeiden der Ventrikularzone *in vitro* über aktivierte SFKs im *downstream signalling* der Eph-Rezeptoren bewirkt wird. SFKs sind auch in die EphA-vermittelte Repulsion kortikaler Neurone (Projekt 4.1.) und retinaler Ganglienzellen (Knoll et al., 2004) involviert. Somit konnte durch die Zugabe von oligomerem EphrinA5-Fc die *in vivo*-Situation, bezüglich der Repulsion der migrierenden kortikalen Interneurone aus der Ventrikularzone, im *slice-Assay* rekonstruiert werden.

5.4. Ein molekularer Schalter für Attraktion und Repulsion

Wie bereits diskutiert, können Eph/Ephrin-Interaktionen sowohl attraktive als auch repulsive Effekte vermitteln und somit in vielfältiger Weise an der Regulation von Migration und der Ausbildung von Zellorganisationen beteiligt sein. In der Literatur wurden bereits duale Effekte von Ephrinen auf verschiedene Populationen von Zellen beschrieben. (Castellani et al., 1998) konnte zeigen, dass EphrinA5 einen attraktiven und repulsiven Effekt auf Axone verschiedener Populationen kortikaler Neurone haben kann. EphrinA5 hat auch auf unterschiedliche Populationen von EphA4-positve Motoneuronen beim Hühnchenembryo eine repulsive oder attraktive Wirkung (Eberhart et al., 2004). B-Ephrine, die im dorsolateralen Mesenchym exprimiert werden, verhindern das Einwandern von frühen migratorischen Neural-Platten-Zellen in dorsale Bereiche und fungieren zu einem späteren Zeitpunkt als positives Signal für die Migration der Melanoblasten (Santiago et al., 2002). Ferner

wurde diskutiert, dass A-Liganden eine differentielle Wirkung auch auf gleiche Populationen von Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentration (Hansen et al., 2004) oder von verschiedenen ECM-Molekülen (Weinl et al., 2003) haben können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Mechanismus für differentielle Antworten der gleichen Zellpopulation auf EphrinA5-Fc dargelegt. EphrinA5 kann auch in Abhängigkeit von der SFK-Aktivität verschiedene Wirkungen auf kortikale Neurone haben. Durch Blockierung der SFK-Aktivität wird die Repulsion im Streifenassay *in vitro* in Attraktion konvertiert. Dies bedeutet, dass der Aktivierungsstatus der SFKs im *downstream-signalling* der Eph-Rezeptoren in die Ephrin-vermittelte Regulation von Repulsion versus Attraktion involviert sein kann. Diese Ergebnisse erinnern an die Daten von Falk et al., 2005 (Falk et al., 2005), die zeigen konnten, dass der Aktivierung der FAK/Src-Signalkaskade eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Sema3B induzierten attraktiven versus repulsiven Effekte auf Neurone der anterioren Kommissur zukommt.

5.5. Die Abgabe von Eph-Rezeptoren ermöglicht migratorische Prozesse

Ein häufig diskutiertes Paradoxon der Eph/Ephrin Interaktionen ist die Frage, wie Repulsion nach hoch-affiner Rezeptor-Liganden-Bindung zwischen Zellen stattfinden kann. Repulsive Interaktionen im EphrinB-System werden durch Zell-Zell-Kontakt induzierte bidirektionale Endocytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes vermittelt (Zimmer et al., 2003), für EphrinA-Liganden wurde eine regulierte enzymatische Abspaltung der extrazellulären Domäne Rezeptorbindung durch Liganden-assoziierte Metalloproteasen beschrieben (Hattori et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die EphA-Rezeptorabgabe nach Ligandenbindung als ein weiterer möglicher Mechanismus dargestellt, der Motilität und Repulsion erlauben und vermitteln kann. Dieser Abgabemechanismus war für EphrinA/EphA Interaktionen bisher noch nicht bekannt.

Dieser Mechanismus der Rezeptorabgabe erinnert an die bei Fibroblasten beschriebene Integrin-Abgabe während der Integrin-vermittelten Migration *in vivo* und *in vitro*, was als *membrane ribbing* bezeichnet wurde (Bard et al., 1975; Chen, 1981; Regen et al., 1992). Das *membrane ribbing* bei der Vorwärtsbewegung der Fibroblasten findet nur an der „Rückseite“ statt, der Region, die zu einer verminderten Ausbildung von Integrin-Zytoskelett-Verbindungen neigt (Schmidt et al., 1993; Lauffenburger et al., 1996). Ferner wurde gezeigt, dass Src als regulatorische Komponente die Reversibilität von Integrin-Zytoskelett Interaktionen fördert und somit durch die Schwächung bzw. Trennung der Verbindungen zwischen den Integrinen und dem Zytoskelet an der Motilität von Zellen beteiligt ist (Felsenfeld et al., 1999). Überträgt man diese Daten auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass die EphA-Rezeptorabgabe nach SFK-Inhibition reduziert wurde, so könnte die EphA-Rezeptoraktivierung SFK-abhängig zu einer lokalen Destabilisierung der Membran durch

reduzierte Integrin-Zytoskelett Verbindungen führen, was das *ribbing* von Membranfragmenten mit den an die Liganden gebundenen Rezeptoren fördern könnte.

Zusätzlich ist bekannt, dass die SFK-Aktivität in einer Inaktivierung von Cortactin resultiert, was wiederum zu einer Verringerung der Aktivität des Arp (*actin-related protein*)-2/3-Komplexes führt, der durch Ausbildung und Vernetzung neuer Aktin-Filamente an der Aktin-Polymerisation beteiligt ist (Huang et al., 1997). Die Cortactin Inaktivierung führt zu einer Inaktivierung des Arp 2/3-Komplexes, was in einer Cofilin-vermittelten Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts resultiert (Weed et al., 2001). Es wurden bereits Interaktionen zwischen EphA-Rezeptoren und Cortactin in Muskelzellen (Lai et al., 2001) und in retinalen Ganglienzellen (Knoll et al., 2004) nachgewiesen. Diese Prozesse könnten zum lokalen Zusammenbruch des Zytoskeletts nahe der EphrinA5-Bindungsstelle führen, was eine Rezeptorabgabe unterstützen könnte.

5.6. Mögliche Funktionen von EphrinA-induzierter Aggregation und Repulsion während der Kortextentwicklung

Während der Ausbildung kortikaler Schichten werden zahlreiche Eph-Rezeptoren und deren Liganden zeitlich und räumlich verschieden im sich entwickelnden Kortex exprimiert (Mackarechtschian et al., 1999; Liebl et al., 2003; Yun et al., 2003; Kudo et al., 2005; Niehage et al., 2005). Am Embryonaltag 14 werden beispielsweise EphrinA2 und EphrinA4 vorwiegend in der Ventrikularzone (VZ), der Subventrikularzone (SVZ) und der Intermediärzone (IZ) exprimiert. EphrinA2 zeigt eine zusätzliche Expression in der kortikalen Platte (KP). Im Gegensatz dazu werden am Embryonaltag 16 die Liganden EphrinA1, EphrinA2 und EphrinA5 nur in der Intermediärzone und der kortikalen Platte ausgebildet. Die Ventrikularzone und die SVZ zeigen bei E16 keine Expression von EphrinA-Liganden mehr. Auch die Rezeptoren zeigen veränderte Expressionsmuster am Embryonaltag 14 und 16. Beispielsweise wird die EphA5-Expression bei E14 in der VZ und IZ am Embryonaltag 16 auf die KP und MZ erweitert, was eine Migration von EphA5-positiven Neuronen aus der VZ in die KP suggeriert (alle Daten von Niehage et al., 2005). Diese zeitlichen Veränderungen der Expressionsmuster von Ephrinen und Eph-Rezeptoren lassen im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit vermuten, dass das Eph/Ephrin-System an der Ausbildung kortikaler Schichten beteiligt sein könnte. A-Ephrine könnten Subpopulationen von neugeborenen Neuronen stimulieren, aus der VZ und der SVZ auszuwandern, in dem sie die Motilität steigern und einen repulsiven Effekt auf bereits ausdifferenzierte Neurone haben. Nach dem Auswandern aus dem Neuroepithel könnten Eph/Ephrin-Interaktionen zwischen Zellen zur Ausbildung von schichtenspezifischen Zell-Zell-Aggregationen somit zur Ausbildung kortikaler Schichten beitragen. Mit dem Zeitpunkt der Geburt eines kortikalen Neurons korreliert dessen Identität und somit die Lokalisation in einer bestimmten Schicht. (Ajioka et al., 2005) haben bereits gezeigt, dass Zellen gleicher Schichtenspezifität durch ähnliche adhäsive Eigenschaften verstärkt untereinander aggregieren, was zur Ausbildung von schichtenspezifischen Verbindungen beitragen könnte. An dieser

schichtenspezifischen Aggregation könnten die Ephrine und deren Rezeptoren beteiligt sein. Dabei kann das Eph/Ephrin-System die Adhäsion indirekt über die Modulation von Zelladhäsionsmolekülen wie L1 (Prevost et al., 2003) oder direkt nach Inhibition der SFKs regulieren. Es ist bereits bekannt, dass die SFK-Aktivität in einem inhibitorischen Rückkopplungs-Mechanismus ausgeschaltet werden kann. Aktivierte SFKs phosphorylieren das *lipid-raft*-assoziierte Protein Cbp, was die Rekrutierung von Csk (C-terminale Src-Kinase) zur Membran bewirkt. Diese phosphoryliert wiederum einen konservierten Tyrosinrest am C-Terminus der SFKs, das schließlich zur Inaktivierung der SFKs führt (Thomas et al., 1997; Cary et al., 2000). Somit könnten die gleichen Eph-Rezeptoren das Auswandern aus dem Neuroepithel sowie die schichtenspezifische Aggregation nach SFK-Inaktivierung vermitteln. Ferner könnte der Aktivierungsstatus der SFKs durch einen „Crosstalk“ mit anderen Signalmolekülen wie den Semaphorinen beeinflusst werden, die ebenfalls im sich entwickelnden Kortex exprimiert werden (Bagnard et al., 1998). Übereinstimmend damit wurden bereits Semaphorin/Src-Interaktionen nachgewiesen (Falk et al., 2005) über die ein „Crosstalk“ stattfinden könnte.

5.7. Mögliche Funktionen des Eph/Ephrin Systems bei der tangentialen Migration der MGE-Neurone

Es ist bekannt, dass an den Embryonaltagen E12,5 bis E14,5 die kortikalen tangential migrierenden Interneurone hauptsächlich von der MGE gebildet werden, die oberhalb oder unterhalb der striatalen Anlage in den Kortex einwandern (Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marin et al., 2001a). Zellen der LGE scheinen zu diesem Zeitpunkt nicht in den Kortex einzuwandern (Anderson et al., 2001; Wichterle et al., 2001). Für die Lenkung und Regulierung der Migration sind Faktoren nötig, die die Motilität der Zellen stimulieren und die Richtung der Migration definieren, sowie Stop-Signale, die das Zielgebiet begrenzen. Die räumlich und zeitlich verschiedenen Expressionsmuster der Ephrine und deren Rezeptoren lassen vermuten, dass sie bei der Regulation dieses Prozesses involviert sind (Niehage et al., 2005). Wie die Experimente der vorliegenden Arbeit darlegen, resultiert die Zugabe von exogenem EphrinA5-Fc nach lokaler Bindung an die Ventrikularzone durch repulsive Interaktionen mit EphA-Rezeptoren der migrierenden Zellen zum Vermeiden der Ventrikularzone. Dies entspricht der Situation *in vivo*, die sich sowohl durch eine EphrinA5-Expression in der Ventrikularzone als auch die Migration kortikaler Interneurone in der Subventrikularzone auszeichnet (Lavdas et al., 1999; Niehage et al., 2005). Der Streifenassay ergab ebenfalls eine repulsive Wirkung von EphrinA5, sowohl auf die Neurone der MGE als auch der LGE. *In vivo* könnte EphrinA5 somit an der Repulsion migrierender Neurone aus der Ventrikularzone beteiligt sein. Repulsion aus der Ventrikularzone ist für die tangential Migration der kortikalen Interneurone und der Interneurone des olfaktorischen Bulbus (Hu, 1999; Wu et al., 1999; Zhu et al., 1999), sowie auch für die radiale Migration der Projektionsneurone des Striatums (Hamasaki et al., 2001) entscheidend. Neben EphrinA5 ist auch Slit1 bei E15 in der Ventrikularzone und Subventrikularzone der ganglionischen Eminenzen exprimiert (Marillat et al., 2002) und zeigt ähnlich wie EphrinA5 eine repulsive Wirkung auf LGE-Neurone *in vitro* (Zhu et al., 1999). Slit1 und EphrinA5 könnten bei der Repulsion der Neurone aus der Ventrikularzone

durch konvergente Signaltransduktionskaskaden zusammen wirken. Eine Konvergenz der Signalwege über SFKs wurde bereits bei dem EphrinA5- und Slit2-induziertem Kollaps der Wachstumskegels retinaler Ganglienzellen beschrieben (Wong et al., 2004).

Neben der Repulsion migrierender Neurone aus der Ventrikularzone könnten Ephrine und Rezeptoren auch an der Ausbildung repulsiver Flanken beteiligt sein, die durch die Begrenzung permissiver Korridore zur korrekten Wegfindung migratorischer kortikaler Interneurone beitragen könnten. Beispielsweise vermeiden kortikale MGE-Neurone den Bereich des sich entwickelnden Striatums und migrieren ober- bzw. unterhalb der striatalen Anlage in den Kortex ein (Marin et al., 2001a). Bisher ist bekannt, dass repulsive Interaktionen der Neuropilin-Rezeptoren der kortikalen Interneurone mit Sema3A und Sema3F der striatalen Anlage an der Vermeidung des sich entwickelnden Striatums beteiligt sind (Marin et al., 2001b). Das veränderte Migrationsmuster kortikaler MGE-Neurone nach Zugabe von EphrinA5-Fc suggeriert darüber hinaus eine Beteiligung des Ephrin/Eph-Systems an der Begrenzung permissiver Korridore für migrierende MGE-Neurone. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, migrieren die MGE-Neurone *in vitro* nach Zugabe von EphrinA5-Fc, sowie nach Applikation von EphrinA5-Fc zusammen mit PP2, in den Bereich der striatalen Anlage ein. Da die Behandlung mit EphrinA5-Fc mit gleichzeitiger Inhibition der SFKs den gleichen Effekt auslöst wie mit intakter SFK-Aktivität, kann man ableiten, dass das EphrinA5-Fc-induzierte Einwandern in die striatale Anlage auf eine Blockierung von Eph-Rezeptoren zurückzuführen sein könnte. Erschwerend für die Interpretation ist die Tatsache, dass verschiedene Ephrine und Eph-Rezeptoren in der striatalen Anlage am Embryonaltag 14 *in vivo* exprimiert sind (Niehage et al., 2005), wodurch kombinatorische Effekt nicht auszuschließen sind. Wie kürzlich von Carvalho et al., 2006 (Carvalho et al., 2006) beschrieben wurde, kann EphrinA5 mit dem EphA3 Rezeptor eine *cis*-Bindung unabhängig von der *trans*-Ligandenbindungsstelle eingehen, was zur Folge hat, dass der Rezeptor durch eine *trans*-Ligandenbindung nicht mehr aktiviert werden kann. Als Modell wurde diskutiert, dass auf diese Art und Weise eine homogene EphA4 und EphA5-Expression in der Retina durch eine graduelle Co-Expression von Ephrin-Liganden in funktionell graduelle Rezeptoraktivitäten übersetzt werden, die für die topographische Projektionen in das Tektum von entscheidender Bedeutung sind. Die Co-Expression von Rezeptoren und Liganden in Regionen in der striatalen Anlage suggeriert die Möglichkeit von derartigen *cis*-Interaktionen, die Rezeptoraktivitäten modulieren können. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um den Einfluss des Eph/Ephrin-Systems bei der Vermeidung der striatalen Anlage während der tangentialen Migration der kortikalen MGE-Neurone genauer aufzuklären.

5.8. Ausblick

Die vorgestellten Experimente konnten für neuronale Zellen weitere, bisher noch nicht bekannte Funktionen des Eph/Ephrin-Systems bei Zell-Zell-Aggregation, Migration und Modulation der Zell-Matrix-Adhäsion während entwicklungsbiologischer Vorgänge aufzeigen. Im ersten Projekt wurde ein neuer Mechanismus zur Vermittlung der Repulsion durch Abgabe von Eph-Rezeptoren herausgestellt werden. Außerdem ergab diese Arbeit weitere Einblicke in die zugrunde liegenden Signalwege der EphA-vermittelten Repulsion *versus* Attraktion bei kortikalen Neuronen. Es bedarf jedoch weiterführende Experimente, um die genaue Funktion der Aggregation und der gesteigerten Motilität durch EphrinA5 bei der Kortexentwicklung herauszustellen. So könnten verschiedene Neuronenpopulationen durch die Verwendung spezifischer Marker und Altersstadien verwendet und untersucht werden, um differentielle Effekte auf Neurone der verschiedenen kortikalen Schichten herauszustellen. Des weiteren sollten verschiedene A-Liganden untersucht werden, um spezifische Wirkungen auf verschiedene Neuronenpopulationen, und eventuelle kompensatorische Mechanismen zu untersuchen, wie die überlappende Expression der verschiedenen Liganden und Rezeptoren im sich entwickelnden Kortex vermuten lässt. Neuere Arbeiten von Carvalho et al. (2006) haben gezeigt, dass zusätzlich zur *trans*-Interaktion von Rezeptor und Ligand, die Rezeptoraktivität durch Bindung eines Liganden an einer *cis*-Interaktionsstelle modifiziert werden kann. Analog dieser Beobachtungen sollte eine eventuelle Co-Expression von Rezeptoren und Liganden der kortikalen Neuronenpopulationen herausgestellt und mögliche *cis*-Interaktionen und deren Auswirkungen auf das *trans*-Eph-*signaling* untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit hat ergeben, dass das Eph/Ephrin-System bei der Regulation der tangentialen Migration involviert ist. Da sich die Expressionsmuster einiger Signalmoleküle *in vitro* verändern, sollten ergänzende *in situ*-Hybridisierungen der Ephrine und Rezeptoren des A- und B-Systems vorgenommen werden. Die Ergebnisse der *slice-overlay* Experimente konnten zusätzlich zur EphrinA5-induzierten Repulsion der MGE-Neurone aus der Ventrikularzone, ein Einwandern in die striatale Anlage nach Manipulation des Eph/Ephrin-Systems durch rekombinante Proteine zeigen, was eine Beteiligung der Ephrine und Eph-Rezeptoren an der Vermeidung der striatalen Anlage durch kortikale Interneurone suggeriert. Für die genaue Interpretation müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden, mit denen die Expressionsmuster der Ephrine und Rezeptoren in dieser Region *in vitro* genau bestimmt werden. Darüber hinaus wäre die Anwendung und Untersuchung eines weiteren *in vitro*-Modells empfehlenswert, mit dem sich die *in vitro*-Artefakte bezüglich der veränderten Expression von Signalmolekülen und die veränderte Migration reduzieren lassen. Das Transplantationsexperiment von EGFP-MGE Neuronen könnte auf das von Kinsbury et al., 2004 entwickelte Modellsystem ausgeweitet werden, bei dem ganze Hemisphären *in vitro* kultiviert werden (Kingsbury et al., 2004). Durch die Kultivierung von Hemisphären statt Gehirnschnitten könnte die Artefaktentstehung eventuell reduziert werden, wodurch die Interpretation für die *in vivo*-Relevanz erleichtert würde.

6. Zusammenfassung

Bei der Ausbildung der Schichten während der kortikalen Entwicklung spielen Adhäsion und Migration eine entscheidende Rolle. Neben zellulären Adhäsionsmolekülen, die Kontakte zwischen Zellen oder zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln, können auch Ephrine und deren Rezeptoren an adhäsiven oder migratorischen Prozessen beteiligt sein, wie Studien vor allem bei nicht-neuronalen Zellen zeigen konnten. Es gibt bereits zahlreiche Arbeiten über die Funktionen der Ephrine und deren Rezeptoren bei der axonalen Lenkung und der Ausbildung topographischer Projektionen während der Entwicklung des Nervensystems. Im Gegensatz dazu ist noch wenig über die Funktionen des Eph/Ephrin-Systems bei der Aggregation und Migration von neuronalen Zellen bekannt. Wie Expressionsstudien ergaben, zeigen die Ephrine und Eph-Rezeptoren im sich entwickelnden Kortex räumlich und zeitlich hoch regulierte Expressionsmuster. Daher befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Rolle von EphrinA5, einem wichtigem Vertreter der A-Ephrine, bei der Aggregation und Migration während der Entwicklung des Telencephalons, und mit der Charakterisierung von zu Grunde liegenden Signalwegen und Mechanismen.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass EphrinA5 die Zell-Zell-Aggregation und Motilität kortikaler Neurone auf homogenem EphrinA5-Fc Substrat *in vitro*, Src-Familie-Tyrosin-Kinasen (SFKs)-abhängig, erhöht. Die Erhöhung der Motilität der Neurone auf homogenem Substrat deutet auf repulsive Eph-Ephrin-Interaktionen hin. Der *Streifenassay*, bei dem die Zellen auf alternierenden Streifen aus EphrinA5-Fc und Kontroll-Protein kultiviert wurden, ergab eine deutliche EphrinA5-induzierte Repulsion kortikaler Neurone *in vitro*. Dieser repulsive Effekt konnte durch Inhibition der SFKs in Attraktion konvertiert werden, die Neurone zeigten ein präferentielles Wachstum auf den EphrinA5 enthaltenen Streifen. Somit wurden in dieser Arbeit die SFKs als molekularer Schalter von Attraktion *versus* Repulsion im Signaltransduktionsweg der EphA-Rezeptoren identifiziert, was einen weiteren Parameter für die Entstehung differentieller Effekte von Ephrinen auf neuronale Zellen darstellt. Darüber hinaus wurde ein neuer Mechanismus gefunden, der nach Rezeptor-Liganden Bindung repulsive Interaktionen ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde im *in vitro*-Modellsystem eine Abgabe von aktivierten EphA-Rezeptoren an das EphrinA5-Fc Substrat beobachtet. Diese EphA-Rezeptorabgabe konnte auch nach Zell-Zell-Kontakt mit EphrinA5-transfizierten Fibroblasten gezeigt werden. Eine *in vivo*-Relevanz und die Konsequenzen für die Interpretationen bestehender Modelle der Gradientenhypothesen müssen weiterführend untersucht werden.

Zur Aufklärung der Beteiligung des Eph/Ephrin-Systems bei der Regulation der tangentialen Migration wurde eine häufig eingesetzte *slice*-Technik verwendet, mit der die Migration EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-markierter Neurone der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) auf coronalen Wildtyp-Schnitten untersucht wurde. Vergleichende Untersuchungen der Migrationsmuster kortikaler Interneurone *in vivo* mit der Migration im *in vitro*-Modell ergaben neben grundlegenden Gemeinsamkeiten allerdings auch Unterschiede. Ein wichtiger Unterschied besteht in der Migration der MGE-Neurone entlang der Ventrikularzone *in vitro*, einer Region, die in *in vivo* deutlich vermieden

wird. Wie *in situ*-Hybridisierungen zeigten, änderte sich auch das Expressionsmuster einiger Eph-Rezeptoren *in vitro*. Darüberhinaus ist EphrinA5, was *in vivo* in der Ventrikularzone exprimiert wird, *in vitro* in dieser Region nicht mehr nachweisbar. Dies legt nahe, dass EphrinA5 *in vivo* an der Repulsion der migrierenden Interneurone aus der Ventrikularzone beteiligt ist. Im Streifenassay hatte EphrinA5 auf die Neurone der medialen und lateralen ganglionischen Eminenz einen deutlichen repulsiven Effekt. Um die Wirkung von EphrinA5 auf die tangential Migration der MGE-Neurone zu untersuchen, wurde der *slice*-Assay unter Zugabe von EphrinA5-Fc im Medium durchgeführt. Bindungsstudien ergaben, dass das rekombinante, multimere EphrinA5-Fc vorwiegend an die Zellen der Ventrikularzone bindet. Funktionell resultierte die EphrinA5-Fc-Präsenz in der Ventrikularzone *in vitro* darin, dass die MGE-Neurone diese Region vermeiden, wodurch die *in vivo*-Situation rekonstruiert werden konnte. Dieser repulsive Effekt wird über SFKs vermittelt und lässt auf eine Beteiligung von EphrinA5 am Auswandern der migrierenden Neurone aus der Ventrikularzone bei der tangentialen Migration *in vivo* und an der Begrenzung des permissiven Korridors für tangential migrierende kortikale Interneurone schließen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ephrine und deren Rezeptoren Aggregation und Migration neuronaler Zellen induzieren und regulieren können. Die Erhöhung der Motilität als Folge repulsiver Interaktionen wird durch eine Rezeptorabgabe vermittelt und kann durch die Inhibition der SFKs in Attraktion umgeschaltet werden. Somit spielt das Eph/Ephrin-System durch die Regulation der Zell-Zell-Adhäsion, der Motilität und Migration eine wichtige Rolle bei der der kortikalen Schichtenbildung während der Entwicklung.

7. Referenzen

- Abram CL, Courtneidge SA (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254:1-13.
- Ajioka I, Nakajima K (2005) Birth-date-dependent segregation of the mouse cerebral cortical neurons in reaggregation cultures. *Eur J Neurosci* 22:331-342.
- Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
- Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, Puschel AW, Bolz J (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125:5043-5053.
- Bard JB, Hay ED (1975) The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement in situ and in vitro. *J Cell Biol* 67:400-418.
- Beggs HE, Soriano P, Maness PF (1994) NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 127:825-833.
- Bell GM, Bolen JB, Imboden JB (1992) Association of Src-like protein tyrosine kinases with the CD2 cell surface molecule in rat T lymphocytes and natural killer cells. *Mol Cell Biol* 12:5548-5554.
- Bolz J, Gilbert CD, Wiesel TN (1989) Pharmacological analysis of cortical circuitry. *Trends Neurosci* 12:292-296.
- Book KJ, Morest DK (1990) Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *J Comp Neurol* 297:55-76.
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544.
- Brown MT, Cooper JA (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287:121-149.
- Bruckner K, Pasquale EB, Klein R (1997) Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275:1640-1643.
- Bruckner K, Pablo Labrador J, Scheiffele P, Herb A, Seeburg PH, Klein R (1999) EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* 22:511-524.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1995) Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 2:963-1108.
- Buonanno A, Fischbach GD (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11:287-296.
- Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC, Ginsberg MH (2002) The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* 277:21749-21758.
- Caras IW (1997) A link between axon guidance and axon fasciculation suggested by studies of the tyrosine kinase receptor EphA5/REK7 and its ligand ephrin-A5/AL-1. *Cell Tissue Res* 290:261-264.
- Carvalho RF, Beutler M, Marler KJ, Knoll B, Becker-Barroso E, Heintzmann R, Ng T, Drescher U (2006) Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci* 9:322-330.
- Cary LA, Cooper JA (2000) Molecular switches in lipid rafts. *Nature* 404:945, 947.
- Castellani V, Yue Y, Gao PP, Zhou R, Bolz J (1998) Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci* 18:4663-4672.

- Chen JH, Wen L, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (2001) The N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *J Neurosci* 21:1548-1556.
- Chen WT (1981) Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J Cell Biol* 90:187-200.
- Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG (1995) Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82:371-381.
- Cheng S, Craig WS, Mullen D, Tschopp JF, Dixon D, Pierschbacher MD (1994) Design and synthesis of novel cyclic RGD-containing peptides as highly potent and selective integrin α IIb β 3 antagonists. *J Med Chem* 37:1-8.
- Coates TD, Watts RG, Hartman R, Howard TH (1992) Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *J Cell Biol* 117:765-774.
- Craven SE, Bredt DS (1998) PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93:495-498.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945-956.
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266:816-819.
- Davy A, Robbins SM (2000) Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *Embo J* 19:5396-5405.
- Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, Robbins SM (1999) Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev* 13:3125-3135.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146-6156.
- de Castro F, Hu L, Drabkin H, Sotelo C, Chedotal A (1999) Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J Neurosci* 19:4428-4436.
- DeDiego I, Smith-Fernandez A, Fairen A (1994) Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* 6:983-997.
- Diverse-Pierluissi M, Remmers AE, Neubig RR, Dunlap K (1997) Novel form of crosstalk between G protein and tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5417-5421.
- Dottori M, Hartley L, Galea M, Paxinos G, Polizzotto M, Kilpatrick T, Bartlett PF, Murphy M, Kontgen F, Boyd AW (1998) EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13248-13253.
- Drescher U, Bonhoeffer F, Muller BK (1997) The Eph family in retinal axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 7:75-80.
- Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, Bonhoeffer F (1995) In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82:359-370.
- Eberhart J, Barr J, O'Connell S, Flagg A, Swartz ME, Cramer KS, Tosney KW, Pasquale EB, Krull CE (2004) Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci* 24:1070-1078.
- Ellis C, Kasmi F, Ganju P, Walls E, Panayotou G, Reith AD (1996) A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* 12:1727-1736.

- Erpel T, Courtneidge SA (1995) Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* 7:176-182.
- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, Sanes JR, Castellani V (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48:63-75.
- Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284:14-30.
- Feldheim DA, Vanderhaeghen P, Hansen MJ, Frisen J, Lu Q, Barbacid M, Flanagan JG (1998) Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 21:1303-1313.
- Felsenfeld DP, Schwartzberg PL, Venegas A, Tse R, Sheetz MP (1999) Selective regulation of integrin--cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol* 1:200-206.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marin O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Flanagan JG, Vanderhaeghen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21:309-345.
- Friedlander DR, Mege RM, Cunningham BA, Edelman GM (1989) Cell sorting-out is modulated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (CAMs) expressed on cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7043-7047.
- Gale NW, Flenniken A, Compton DC, Jenkins N, Copeland NG, Gilbert DJ, Davis S, Wilkinson DG, Yancopoulos GD (1996a) Elk-L3, a novel transmembrane ligand for the Eph family of receptor tyrosine kinases, expressed in embryonic floor plate, roof plate and hindbrain segments. *Oncogene* 13:1343-1352.
- Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, Henkemeyer M, Streibhardt K, Hirai H, Wilkinson DG, Pawson T, Davis S, Yancopoulos GD (1996b) Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 17:9-19.
- Gao PP, Yue Y, Zhang JH, Cerretti DP, Levitt P, Zhou R (1998) Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5329-5334.
- Garcia-Alvarez B, Bobkov A, Sonnenberg A, de Pereda JM (2003) Structural and functional analysis of the actin binding domain of plectin suggests alternative mechanisms for binding to F-actin and integrin beta4. *Structure* 11:615-625.
- Garey LJ, Powell TP (1971) An experimental study of the termination of the lateral geniculo-cortical pathway in the cat and monkey. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 179:41-63.
- Gauthier LR, Robbins SM (2003) Ephrin signaling: One raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? *Life Sci* 74:207-216.
- Giger RJ, Wolfer DP, De Wit GM, Verhaagen J (1996) Anatomy of rat semaphorin III/collapsin-1 mRNA expression and relationship to developing nerve tracts during neuroembryogenesis. *J Comp Neurol* 375:378-392.
- Gilbert CD, Kelly JP (1975) The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol* 163:81-105.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120-125.
- Godt D, Tepass U (1998) Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* 395:387-391.
- Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22:6309-6314.

- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
- Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y (2001) A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J Neurosci* 21:4272-4280.
- Hansen MJ, Dallal GE, Flanagan JG (2004) Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron* 42:717-730.
- Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289:1360-1365.
- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R (1996) Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 86:35-46.
- Himanen JP, Nikolov DB (2003) Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* 26:46-51.
- Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, Cowan CA, Henkemeyer M, Nikolov DB (2001) Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414:933-938.
- Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7:501-509.
- Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238:1717-1720.
- Hock B, Bohme B, Karn T, Yamamoto T, Kaibuchi K, Holtrich U, Holland S, Pawson T, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K (1998) PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9779-9784.
- Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T (1996) Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383:722-725.
- Holmberg J, Clarke DL, Frisen J (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408:203-206.
- Hu H (1999) Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23:703-711.
- Huai J, Drescher U (2001) An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem* 276:6689-6694.
- Huang C, Ni Y, Wang T, Gao Y, Haudenschild CC, Zhan X (1997) Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:13911-13915.
- Hubbard SR, Till JH (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69:373-398.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-154.
- Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO (1999) Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins. *Embo J* 18:2165-2173.
- Huynh-Do U, Vindis C, Liu H, Cerretti DP, McGrew JT, Enriquez M, Chen J, Daniel TO (2002) Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci* 115:3073-3081.
- Hynes RO, Lander AD (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303-322.
- Ignelzi MA, Jr., Miller DR, Soriano P, Maness PF (1994) Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12:873-884.

- Kaplan KB, Swedlow JR, Morgan DO, Varmus HE (1995) c-Src enhances the spreading of src^{-/-} fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev* 9:1505-1517.
- Kaplan KB, Bibbins KB, Swedlow JR, Arnaud M, Morgan DO, Varmus HE (1994) Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *Embo J* 13:4745-4756.
- Katz LC, Callaway EM (1992) Development of local circuits in mammalian visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 15:31-56.
- Kingsbury MA, Rehen SK, Ye X, Chun J (2004) Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling during cortical neurogenesis. *J Cell Biochem* 92:1004-1012.
- Klein R (2004) Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16:580-589.
- Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P (1999) Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *Embo J* 18:2459-2471.
- Knoll B, Drescher U (2002) Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 25:145-149.
- Knoll B, Drescher U (2004) Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24:6248-6257.
- Kudo C, Ajioka I, Hirata Y, Nakajima K (2005) Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *J Comp Neurol* 487:255-269.
- Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:475-486.
- Labrador JP, Brambilla R, Klein R (1997) The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *Embo J* 16:3889-3897.
- Lackmann M, Oates AC, Dottori M, Smith FM, Do C, Power M, Kravets L, Boyd AW (1998) Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* 273:20228-20237.
- Lackmann M, Mann RJ, Kravets L, Smith FM, Bucci TA, Maxwell KF, Howlett GJ, Olsson JE, Vanden Bos T, Cerretti DP, Boyd AW (1997) Ligand for EPH-related kinase (LERK) 7 is the preferred high affinity ligand for the HEK receptor. *J Biol Chem* 272:16521-16530.
- Lai KO, Ip FC, Cheung J, Fu AK, Ip NY (2001) Expression of Eph receptors in skeletal muscle and their localization at the neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci* 17:1034-1047.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19:7881-7888.
- Lawson MA, Maxfield FR (1995) Ca²⁺- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377:75-79.
- Liebl DJ, Morris CJ, Henkemeyer M, Parada LF (2003) mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res* 71:7-22.
- Livesey FJ, Hunt SP (1997) Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 8:417-429.
- Lund RD, Mustari MJ (1977) Development of the geniculocortical pathway in rats. *J Comp Neurol* 173:289-306.
- Mackarehtschian K, Lau CK, Caras I, McConnell SK (1999) Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex* 9:601-610.
- Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J (2002) Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development* 129:3945-3955.

- Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal A (2002) Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130-155.
- Marin O, Rubenstein JL (2001a) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.
- Marin O, Rubenstein JL (2003a) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
- Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2001b) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293:872-875.
- Marin O, Plump AS, Flames N, Sanchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2003b) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130:1889-1901.
- McConnell SK (1988) Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res* 472:1-23.
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG (1999) Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400:77-81.
- Miao H, Burnett E, Kinch M, Simon E, Wang B (2000) Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol* 2:62-69.
- Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17:2018-2029.
- Misson JP, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS, Jr. (1991) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1:221-229.
- Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.
- Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Loschinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Muller BK, Bonhoeffer F, Drescher U (1997) Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *Embo J* 16:1258-1267.
- Morse WR, Whitesides JG, 3rd, LaMantia AS, Maness PF (1998) p59fyn and pp60c-src modulate axonal guidance in the developing mouse olfactory pathway. *J Neurobiol* 36:53-63.
- Muller BK, Bonhoeffer F, Drescher U (1996) Novel gene families involved in neural pathfinding. *Curr Opin Genet Dev* 6:469-474.
- Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143-150.
- Nagashima K, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N (2002) Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol Biol Cell* 13:4231-4242.
- Narisawa-Saito M, Yamanashi Y, Morioka T, Oite T, Shimizu F (1996) Thy-1 molecule associates with protein tyrosine kinase(s) in rat mesangial cells. *Clin Exp Immunol* 106:86-90.
- Niehage R, Peukert C, Bolz J, Weth F (2005) Developmental expression of Ephrin/Eph wiring molecules in mouse homologs of schizophrenia-related brain regions. In: *SfN 35th Annual Meeting*. Washington.
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54:993-1001.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319.

- Olivier C, Cobos I, Perez Villegas EM, Spassky N, Zalc B, Martinez S, Thomas JL (2001) Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128:1757-1769.
- Orioli D, Henkemeyer M, Lemke G, Klein R, Pawson T (1996) Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *Embo J* 15:6035-6049.
- Orsulic S, Peifer M (1996) An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. *J Cell Biol* 134:1283-1300.
- Pandey A, Lazar DF, Saltiel AR, Dixit VM (1994) Activation of the Eck receptor protein tyrosine kinase stimulates phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Biol Chem* 269:30154-30157.
- Pandey A, Shao H, Marks RM, Polverini PJ, Dixit VM (1995) Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science* 268:567-569.
- Parsons JT (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116:1409-1416.
- Pasquale EB (1997) The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol* 9:608-615.
- Pawson T (1997) New impressions of Src and Hck. *Nature* 385:582-583, 585.
- Pawson T, Bernstein A (1990) Receptor tyrosine kinases: genetic evidence for their role in Drosophila and mouse development. *Trends Genet* 6:350-356.
- Pawson T, Nash P (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 14:1027-1047.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129:3147-3160.
- Powell EM, Mars WM, Levitt P (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30:79-89.
- Prevost N, Woulfe D, Tanaka T, Brass LF (2002) Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9219-9224.
- Prevost N, Woulfe D, Tognolini M, Brass LF (2003) Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *J Thromb Haemost* 1:1613-1627.
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* 141:283-312.
- Rakic P (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
- Regen CM, Horwitz AF (1992) Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 119:1347-1359.
- Robbins SM, Quintrell NA, Bishop JM (1995) Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol* 15:3507-3515.
- Rodier JM, Valles AM, Denoyelle M, Thiery JP, Boyer B (1995) pp60c-src is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line. *J Cell Biol* 131:761-773.
- Rougon G, Hobert O (2003) New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu Rev Neurosci* 26:207-238.
- Ryan TC, Cruikshank WW, Kornfeld H, Collins TL, Center DM (1995) The CD4-associated tyrosine kinase p56lck is required for lymphocyte chemoattractant factor-induced T lymphocyte migration. *J Biol Chem* 270:17081-17086.

- Santiago A, Erickson CA (2002) Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 129:3621-3632.
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122:789-807.
- Sastry SK, Horwitz AF (1993) Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5:819-831.
- Schaller MD, Parsons JT (1993) Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 3:258-262.
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.
- Schmidt CE, Horwitz AF, Lauffenburger DA, Sheetz MP (1993) Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol* 123:977-991.
- Schmidt CE, Dai J, Lauffenburger DA, Sheetz MP, Horwitz AF (1995) Integrin-cytoskeletal interactions in neuronal growth cones. *J Neurosci* 15:3400-3407.
- Simon MA (2000) Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103:13-15.
- Skaliora I, Singer W, Betz H, Puschel AW (1998) Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci* 10:1215-1229.
- Song J, Vranken W, Xu P, Gingras R, Noyce RS, Yu Z, Shen SH, Ni F (2002) Solution structure and backbone dynamics of the functional cytoplasmic subdomain of human ephrin B2, a cell-surface ligand with bidirectional signaling properties. *Biochemistry* 41:10942-10949.
- Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H (1991) GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254:1016-1019.
- Stein E, Huynh-Do U, Lane AA, Cerretti DP, Daniel TO (1998a) Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem* 273:1303-1308.
- Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL, Daniel TO (1998b) Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* 12:667-678.
- Steinberg MS (1970) Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J Exp Zool* 173:395-433.
- Suetsugu S, Hattori M, Miki H, Tezuka T, Yamamoto T, Mikoshiba K, Takenawa T (2002) Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* 3:645-658.
- Sullivan SJ, Daukas G, Zigmond SH (1984) Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 99:1461-1467.
- Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE, Greenberg ME (2002) Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science* 295:491-495.
- Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455.
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17:8313-8323.
- Tan SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PP, Reese BE, Faulkner-Jones B (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21:295-304.

- Taniguchi T, Miyazaki T, Minami Y, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Hatakeyama M, Liu ZJ (1995) IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 766:235-244.
- Thanos CD, Goodwill KE, Bowie JU (1999) Oligomeric structure of the human EphB2 receptor SAM domain. *Science* 283:833-836.
- Thomas PM, Samelson LE (1992) The glycoposphatidylinositol-anchored Thy-1 molecule interacts with the p60fyn protein tyrosine kinase in T cells. *J Biol Chem* 267:12317-12322.
- Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:513-609.
- Torii M, Levitt P (2005) Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 48:563-575.
- Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Huganir RL, Bredt DS, Gale NW, Yancopoulos GD (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21:1453-1463.
- Toth J, Cutforth T, Gelinis AD, Bethoney KA, Bard J, Harrison CJ (2001) Crystal structure of an ephrin ectodomain. *Dev Cell* 1:83-92.
- Turner CE (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2:E231-236.
- Tuzi NL, Gullick WJ (1994) eph, the largest known family of putative growth factor receptors. *Br J Cancer* 69:417-421.
- Uziel D, Muhlfriedel S, Zarbalis K, Wurst W, Levitt P, Bolz J (2002) Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci* 22:9352-9357.
- Valcanis H, Tan SS (2003) Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J Neurosci* 23:5113-5122.
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251-337.
- Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB (1989) Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 289:213-227.
- Vindis C, Cerretti DP, Daniel TO, Huynh-Do U (2003) EphB1 recruits c-Src and p52Shc to activate MAPK/ERK and promote chemotaxis. *J Cell Biol* 162:661-671.
- Weed SA, Parsons JT (2001) Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20:6418-6434.
- Weinl C, Drescher U, Lang S, Bonhoeffer F, Loschinger J (2003) On the turning of *Xenopus* retinal axons induced by ephrin-A5. *Development* 130:1635-1643.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2:461-466.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
- Wilkinson DG (2000) Topographic mapping: organising by repulsion and competition? *Curr Biol* 10:R447-451.
- Wimmer-Kleikamp SH, Janes PW, Squire A, Bastiaens PI, Lackmann M (2004) Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J Cell Biol* 164:661-666.
- Winslow JW, Moran P, Valverde J, Shih A, Yuan JQ, Wong SC, Tsai SP, Goddard A, Henzel WJ, Hefti F, et al. (1995) Cloning of AL-1, a ligand for an Eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron* 14:973-981.

- Wong EV, Kerner JA, Jay DG (2004) Convergent and divergent signaling mechanisms of growth cone collapse by ephrinA5 and slit2. *J Neurobiol* 59:66-81.
- Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400:331-336.
- Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG (1999) In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399:267-271.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612-2622.
- Xu W, Harrison SC, Eck MJ (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602.
- Yau HJ, Wang HF, Lai C, Liu FC (2003) Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13:252-264.
- Yuan W, Zhou L, Chen JH, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM (1999) The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212:290-306.
- Yun ME, Johnson RR, Antic A, Donoghue MJ (2003) EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J Comp Neurol* 456:203-216.
- Zhu Y, Li H, Zhou L, Wu JY, Rao Y (1999) Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23:473-485.
- Zimmer M, Palmer A, Kohler J, Klein R (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5:869-878.
- Zisch AH, Pasquale EB (1997a) The Eph family: a multitude of receptors that mediate cell recognition signals. *Cell Tissue Res* 290:217-226.
- Zisch AH, Kalo MS, Chong LD, Pasquale EB (1998) Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* 16:2657-2670.
- Zisch AH, Stallcup WB, Chong LD, Dahlin-Huppe K, Voshol J, Schachner M, Pasquale EB (1997b) Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cek5. *J Neurosci Res* 47:655-665.

8. Anhang

8.1. Puffer, Lösungen und Reagenzien

Für *in vitro*-Experimente wurden ausschließlich sterile Lösungen und Puffer verwendet. Lösungen und Puffer, deren Sterilität nicht vom Hersteller garantiert war, wurden entweder sterilfiltriert (Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm von Sartolab V 115; SARTORIUS) oder für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Falls nicht anders angegeben wurde bidestilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

8.1.1. Primärkultur

PBS:	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ pH = 7,4 Lagerung bei 4 °C
GBSS:	1,53 mM CaCl ₂ 3,66 mM KCl 0,22 mM KH ₂ PO ₄ 1,03 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,28 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 138 mM NaCl 2,70 mM NaHCO ₃ 0,84 mM Na ₂ HPO ₄ 5,56 mM Glukose Lagerung bei 4 °C
65 % Glukose-Stamm-Lösung (m/v):	32,5 g D-(+)-Glukose in 50 ml Bidest Lagerung bei -20 °C
0,25 % Trypsin (v/v):	25 %iges Trypsin 1:10 in PBS Lagerung bei -20 °C
Präpariermedium:	0,65 % Glukose in GBSS frisch vor Gebrauch angesetzt

Sammelmedium:	0,65% Glukose in HBSS ohne Kalizium und Magnesium vor Gebrauch frisch angesetzt
Kulturmedium für primäre kortikale Einzelzellen:	10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum 1 % Penicillin/Streptomycin 200 mM L-Glutamin 0,1 % D-Glucose in DMEM mit Natriumpyrovat und Pyridoxin Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C
Kulturmedium für Time-Lapse-Videomikroskopie:	entspricht dem Kulturmedium mit 250 mM HEPES Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C
Elektroporationsmedium:	0,65 % Glukose 20 mM HEPES in HBSS ohne Kalzium und Magnesium Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C
Kulturmedium für coronale Schnitte:	60 % D-MEM/F12 30 % HBSS 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum 1 % Penicillin/Streptomycin 0,65 % D-Glucose

8.1.2. Lösungen und Medien für die Zellkultur mit NIH/3T3-Fibroblasten

Zellkulturmedium:	10 % hitzeinaktiviertes FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,4 % Geneticin G 418 (nur bei EphrinA5-transfizierten Zellen) in DMEM/F12-HAM Lagerung bei 4 °C
Einfriermedium:	90 % Zellkulturmedium 10 % DMSO

8.1.3. Sonstige Lösungen

Chloralhydrat: 7% Chloralhydrat
in PBS
Lagerung bei Raumtemperatur

PP-2 Stamm-Lösung: 10 mM
in DMSO
Lagerung bei -20 °C

PP-3 Stamm-Lösung: 10 mM
in DMSO
Lagerung bei -20 °C

8.1.4. Fixierung und Immunhistochemie

Fixierlösung: 4 % PFA
in PBS bei 60°C gelöst
pH=7,4;
Lagerung bei -20 °C

Waschpuffer: 0,2 % Triton-X-100
in PBS
Lagerung bei 4 °C

Blockierungslösung: 1 % BSA
0,2 % Triton-X-100
in PBS
Lagerung bei 4 °C

Mowiol/n-Propyl-Gallat: 25 % Mowiol 4-88 (m/v)
50 % Glycerin (v/v)
17,5 % n-Propyl-Gallat (m/v)
0,03 % Timerosal
in PBS
Lagerung bei -20°C

modifiziertes HBSS: 0,5 mg/ml BSA
20 mM HEPES
in HBSS
Lagerung bei 4 °C

Puffer B3: 0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂
0,05 Tris (pH 9,5)
Lagerung bei 4 °C

Farbreaktionspuffer: 4,5 µl NBT
3,5 µl BCIP
in 1 ml Puffer B3

8.1.5. Immunpräzipitation

Lysepuffer: 50 mM Tris; pH=7,4
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 % Triton-X-100
1 mM Na₃VO₄
1 mM NaF
2,5 mM NaP-P
pH=7,4
Lagerung bei -20°C

Proteaseinhibitoren: wurden dem Lysepuffer kurz vor Gebrauch in folgenden Endkonzentrationen frisch zugesetzt:
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
5 µg/ml Pepstatin-A
25 µg/ml Aprotinin
15,4 µg/ml 2,3-Dehydro-Neuraminsäure
25 µg/ml Leupeptin

50 % Protein A-Sepharose

Gebrauchslösung: 500 µl Protein A-Sepharose
500 µl Lyspuffer ohne Proteaseinhibitoren
Lagerung bei 4 °C

8.1.6. enzymatische Abspaltung des IgG₁ von rekombinantem EphrinA5-Fc

Faktor X Puffer: 20mM Tris-HCl
200mM NaCl
pH 8.0; Lagerung bei 4 °C

8.1.7. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

ECL-Protein Molekulargewichtsmarker (AMERSHAM): Lagerung bei -20 °C

Name der Markerproteine (Biotin-gekoppelt)	MW in Da
Phosphorylase b	97000
Rinder-Serum-Albumin	66000
Ovalbumin	45000
Karbonische Anhydrase	31000
Trypsin Inhibitor	20100
Lysozym	14400

SDS- Molekulargewichtsmarker (SIGMA): Lagerung bei -20 °C

Name der Markerproteine	MW in Da
Rinder-Serum-Albumin	66000
Fumarase	48500
Karbonische Anhydrase	29000
β-Lactoglobulin	18200
α-Lactalbumin	14200

Blotting-Puffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol
0,02 % SDS.
pH-Wert = 8,3
Lagerung bei RT

Nitrocellulose (NC)-Puffer:	10 mM Tris
	0,9 % NaCl
	0,05 % Tween 20
	pH-Wert = 7,4
	Lagerung bei RT

8.1.8. Materialien zur Amplifizierung des pEYFPmem-Vectors in E.coli und dessen Isolation

SOC Medium:	20 g/l Pepton
	5 g/l Hefeextrakt
	0,5 g/l NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	20 mM Glukose (steril)
	in Bidest
	pH-Wert = 7

LB-Agar:	10 g/l Pepton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	1 mM NaOH
	15 g/l Agar
	30 µg/ml Kanamycin
	Lagerung bei 4 °C

LB-Medium:	10 g/l Pepton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	1 mM NaOH
	30 µg/ml Kanamycin
	Lagerung bei 4 °C

8.1.9. Puffer für RNA- und DNA-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:	40 mM Tris
	20 mM Essigsäure
	1 mM EDTA.

TBE-Puffer:	90 mM Borsäure
	90 mM Tris

1 mM EDTA

8.1.10. Puffer für *in situ*-Hybridisierung

Hybridisierungslösung für dicke Schnitte: 50 % Formamid
5 x SSC, pH = 7
1 mg/ml Torula RNA
0,1 % Tween
0,2 % SDS
5 mM EDTA;
Lagerung bei -20 °C
300 ng / 100 µl Sonde kurz vor Gebrauch zugeben

Posthybridisierungslösung für dicke Schnitte:

50 % Formamid
5 x SSC
1 % SDS

Hybridisierungslösung für Kryostatschnitte:

50 % Formamid
5 x SSC, pH = 7
0,4 mg/ml Torula RNA
0,1 mg/ml tRNA
3 ng/ml Sonde
3 min bei 100°C
5 x Denhardt's Reagenz

Blockierungslösung:

1 % BSA
2 % Boehringer Blockierungsreagenz
in MabS/0,1 % Tween

MabS:

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH=7,5 mit NaOH

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M Trinatriumcitrat
pH=7 mit HCl

Reaktionspuffer:

0,1 M Tris
0,1 M NaCl
5 mM MgCl₂

8.2. weitere Materialien

8.2.1. rekombinante Proteine

Protein	Hersteller
EphrinA5-Fc	R&D SYSTEMS
IgG Isotyp-Kontrolle	ROCKLAND INC.

8.2.3. Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Maus-anti-Phosphotyrosin 4G10	UPSTATE	1:2000
Hase-anti-EphA5, polyklonal	SANTA CRUZ	1:500
Maus-anti-SMI 312, polyklonal	STERNBERGER MONOCLONALS INC	1:1000
Maus-anti-Phosphotyrosin (PY) 99, monoklonal	SANTA CRUZ	1:500
Hase-anti-EphA4, polyklonal	SANTA CRUZ	1:800
Hase-anti-Src, polyklonal	SANTA CRUZ	1:100

Sekundäre Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
Ziege-anti-Mensch IgG (H+L)	VECTOR	30 µg/ml
Alexa488-gekoppelt Ziege-anti-Mensch IgG (H+L)	MOLECULAR PROBES	80 µg/ml
Cy2-konjugiert Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	DIANOVA	1:100
Cy3-konjugiert Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	DIANOVA	1:800
Cy3-konjugiert Ziege-anti-Hase IgG (H+L)	DIANOVA	1:800
Peroxidase-gekoppelt Esel-anti-Ziege-IgG (H+L)	DIANOVA	1:40000
Peroxidase-gekoppelt Ziege-anti-Hase-IgG (H+L)	DIANOVA	1:20000

8.2.4. Enzyme

Name	Hersteller	Enzymtyp
Pst-1	FERMENTAS	Restriktionsendonukleasen
„RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	FERMENTAS	RNA und DNA-abhängige DNA-Polymerase
HotStarTaq-Polymerase	QUIAGEN	DNA-abhängige-DNA-Polymerase
Rekombinanter humaner Coagulationsfaktor FaktorX	R&D SYSTEMS	Vitamin K-abhängige Protease

8.2.5. Sonden

Es wurden DIG-markierte RNA Sonden verwendet. Die Lhx6- und die EphrinA5-Sonde wurde freundlicherweise von Ronny Niehage, die Sonden für EphA3, A4 und A5 von Katharina Merz und Sandra Barchmann zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen von der EphA3-, A4- und A5-Sonden sind in der Diplomarbeit von Katharina Merz aufgeführt. Die Sequenzen der Sonden für Lhx6 und EphrinA5 (Efna5) können mit Hilfe der Daten aus Tabelle 8.2.5. ermittelt werden. Die Längen, GC-Gehalte und Hybridisierungstemperaturen der einzelnen Sonden sind in Tab. 8.2.5.1. aufgeführt.

Gen	Acc#	Primersequenz		Position
Lhx6	NM_008500	for rev	<u>tgggtacc</u> AAGGTAGAGCCTCCCATGTACG <u>tggagctc</u> GCCCTCTTGAGGTTCTCGATC	248 - 714
Efna5	NM_010109	for rev	<u>agggtacc</u> GCTACGCCGTCTACTGGAAC <u>aaccgctc</u> GACGGGAGGAGACTGTGCTA	106 - 637

Tab. 8.2.5.: Mittels der Accessory-Nummer (Acc#) kann in Pubmed die Sequenz der Lhx6 und EphrinA5-mRNA erhalten werden, gegen die die Sonden mit den angegebenen *forward* (for) und *reverse* (rev) Primer und der entsprechenden Positionen hergestellt wurden.

	Länge der Sonde [nt]	GC-Gehalt [%]	T_m^{DIG} RNA-RNA Hybride [°C]
Lhx6	467	57	73
EphrinA5	431	50	67
EphA3	1014	49	81
EphA4	717	52	82
EphA5	755	47	79

Tab. 8.2.5.1: Zusammenfassung der Längen, GC-Gehalte und Hybridierungstemperaturen der verwendeten Sonden.

8.2.6. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
(4-Amino-7-Phenylpyrazolo [3,4-d]Pyrimidin) (PP3)	CALBIOCHEM
2,3-Dehydro-Neuraminsäure	SIGMA
4-Amino-5-(4-Chlorophenyl)-7- (t-Butyl)pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin (PP2)	CALBIOCHEM
ABC-Reagenz	VECTSTATIN
Agarose	ROTH
Aprotinin	SIGMA
BCIP	ROCHE
Borsäure	ROTH
CaCl ₂	SIGMA
Chloralhydrat	SIGMA
Chloroform	MERCK
DAPI	SIGMA
DMEM	INVITROGEN
DMEM/F12-HAM	SIGMA
DMSO	INVITROGEN

dNTP	AMERSHAM
ECL	AMERSHAM
EDTA	SIGMA
EphrinA5-Fc	R&D SYSTEMS
Essigsäure	ROTH
EtOH	MERCK
Fc	ROCKLAND INC.
Fixiersalz	SIGMA
Fötales Kälberserum	INVITROGEN
GeneRuler™ 100 bp DNA-ladder Plus	FERMENTAS
Geneticin G 418-Stamm	INVITROGEN
Glukose	SIGMA
Glycerin	SIGMA
HBSS	INVITROGEN
Hefeextrakt	ROTH
HEPES	ROTH
Isopropylalkohol	SIGMA
Kanamycin	SIGMA
KCl	MERCK
KH ₂ PO ₄	MERCK
Kodack D19 Entwickler	SIGMA
Laminin	SIGMA
Leupeptin	SIGMA
Levamisol	SIGMA
Methanol	ROTH
MgCl ₂	MERCK
MgCl ₂ -6 H ₂ O	MERCK
MgSO ₄ -7 H ₂ O	MERCK
Mineralöl	SIGMA

MOPS-Laufpuffer 20X	INVITROGEN
Mowiol4-88	CALBIOCHEM
Na ₂ HPO ₄	SIGMA
Na ₃ VO ₄	SIGMA
NaCl	ROTH
NaF	SIGMA
NaHCO ₃	SIGMA
NaOH	MERCK
NBT	ROCHE
n-Propyl-Gallat	SIGMA
Paraformaldehyd	MERCK
Penicillin/Streptomycin	INVITROGEN
PepstatinA	SIGMA
Pepton	INVITROGEN
Phenylmethylsulfonylfluorid	SIGMA
Poly-l-lysin	SIGMA
Probenpuffer für SDS PAGE	INVITROGEN
ProteinA-Sepahrose	AMERSHAM
Proteinmarker RPN 2107	AMERSHAM
Reduzierungsagens	INVITROGEN
Ribonukleaseinhibitor	INVITROGEN
Sodium-Dodecyl-Sulfat	ROTH
Tetramisol	SIGMA
Timerosal	SIGMA
Tris	SIGMA
Triton-X-100	SIGMA
Trypsin	INVITROGEN
Tween 20	MERCK

8.2.7. Geräte

Name	Hersteller
2 Photonen konfokales Laser-Scanning-Mikroskop-LSM 510	ZEISS
Axiovert S-100 inverses Mikroskop	ZEISS
CCD Videokamera	PLAYTYPUS
CTI-Controller 3700 digital	ZEISS
Coolpix Digitalkamera	NIKON
Electrophoresis Power Supply	GIBCO BRL
Elektroporationskammer	Dr. L. Fischer Heidelberg
Elektroporationsimpulsgenerator EPI 2500	Dr. L. Fischer Heidelberg
Fastblot B43	BIOMETRA
Festwinkelrotor F45-30-11	EPPENDORF
Hot-beat-Sterilisator	FINE SCIENCE TOOLS
Inkubator HERA cell	HERAEUS
Kryostat	LEICA
Laminarbox HERA SAFE	HERAEUS
Mastercycler Gradient	EPPENDORF
petriPERM 50 hydrophilic	SATORIUS
Plantisch	ZEISS
Spot Kamera	VISITRON SYSTEMS
Tempcontrol 37-2 digital	ZEISS
Tissue Chopper	THE MICKLE LABORATORY ENGINEERING
UV-visible Spektrophotometer UV-1601	SHIMADZU
XCell 2-Elektrophoresekammer	NOVEX
Zentrifuge „Biofuge Stratos“	HERAEUS

8.2.8. Weitere Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Nitrozellulosemembran	AMERSHAM
3 MM Filterpapier	AMERSHAM
4-12 % ige Bis-Tris Gradientengele	INVITROGEN

8.3. Zusatzmaterial: Time-Lapse Aufnahmen

Die beiliegende CD enthält die Time-lapse Aufnahmen, aus denen die im Ergebnisteil dargestellten Sequenzen entnommen wurden.

Film 1: kortikale Neurone auf homogenem EphrinA5-Fc, 3 bis 18 h *in vitro*, Sequenzen dargestellt in Abb. 4.1.2.2. A und Abb. 4.1.3.1.

Film 2: kortikale Neurone auf homogenem Kontrollprotein, 3 bis 18 h *in vitro*, Sequenzen dargestellt in Abb. 4.1.2.2. B

Film 3: kortikale Neurone auf homogenem EphrinA5-Fc mit inhibierter SFKs-Funktion durch 5 μ M PP2, 3 bis 18 h *in vitro*, Sequenzen dargestellt in Abb. 4.1.3.1.

Film 4: kortikale Neurone auf alternierenden Streifen aus EphrinA5-Fc (dunkel unterlegt) und Kontrollprotein, 3 bis 9 h *in vitro*, Sequenzen dargestellt in Abb. 4.1.4.2.

Film 5: kortikale Neurone in Co-Kultur mit EphrinA5-transfizierten NIH/3T3-Fibroblasten, 24 bis 35 h *in vitro*, dargestellt in Abb. Abb. 4.1.7. B

Film 6: kortikale Neurone in Co-Kultur mit untransfizierten Kontroll-NIH/3T3-Fibroblasten, 24 bis 30 h *in vitro*, dargestellt in Abb. Abb. 4.1.7. C

Film 7: tangential migrierende EGFP-markierte MGE-Neurone auf einem coronalen Wildtyp-Schnitt, 24 bis 44 h *in vitro*, dargestellt in Abb. 4.2.5.3. A und Abb. 4.2.5.4. A. Der Fluoreszenz-Time-Lapse Aufnahme wurde eine Durchlichtaufnahme des Schnittes unterlegt.

Film 8: tangential migrierende EGFP-markierte MGE-Neurone auf einem coronalen Wildtyp-Schnitt mit 5 μ M EphrinA5-Fc im Medium, 24 bis 31 h *in vitro*, dargestellt in Abb. 4.2.5.3. B und Abb. 4.2.5.4. B. Der Fluoreszenz-Time-Lapse Aufnahme wurde eine Durchlichtaufnahme des Schnittes unterlegt.

8.4. Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Abb	Abbildung
AEP	Area Entopedunculare
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bidest	bidestilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrokarbonat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
EDTA	Ethylidiamintetraessigsäure
Efn	Ephrin
FBS	fötales Kälberserum
GBSS	Gey's balanced salt solution
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IZ	Intermediärzone
kb	Kilobasen
KP	kortikale Platte
LB	Luria Broth
LGE	laterale ganglionische Eminenz
M	Molar
min	Minuten
MGE	mediale ganglionische Eminenz
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA
mU	milli Units
MZ	Marginalzone
n	Stichprobenumfang
NBT	Nitroblue Tetrazolium Chlorid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI-PLC	Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase C
PP2	4-Amino-5-(4-Chlorophenyl)-7-(t-Butyl)pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin
PP3	4-Amino-7-Phenylpyrazolo[3,4-d]Pyrimidin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung
SVZ	Subventrikularzone
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
tRNA	Transfer-RNA
U	Units
VZ	Ventrikularzone

8.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Dissertation wurde weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung, noch an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Geraldine Zimmer

8.6. Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herr Prof. Dr. Jürgen Bolz bedanken, dafür dass ich mein Thema in seinem Labor und seiner Arbeitsgruppe bearbeiten konnte und für seine fachliche und persönliche Betreuung. Er stand mir mit konstruktiver Kritik als Diskussionspartner zur Verfügung und half mir sehr bei der Zusammenstellung dieser Arbeit. Darüber hinaus gilt mein Dank auch seinem Einsatz für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit, durch die mir erfahrungsreiche Auslandsaufenthalte und die Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen ermöglicht wurden, die wichtig und bereichernd für den Fortgang meiner Projekte waren, und zum Teil auch wegweisend für meine weitere Arbeit sind.

Bei Patricia Pestana-Garcez möchte ich mich herzlich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, und für die technische Einführung und hilfreiche Unterstützung bei der Bearbeitung des zweiten Projektes bedanken. Ich danke dir auch für deine private und fachliche Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit in Rio de Janeiro.

Ein großes Dankeschön schulde ich André Güllmar, der mir vor allem bei technischen Problemen immer hilfreich und geduldig, aber auch privat zur Seite stand. Bei Tina Rüdiger bedanke ich mich für die lange, freundschaftliche, rücksichtsvolle und angenehme Zusammenarbeit im Labor und ihr stets offenes Ohr für alle Arten von Problemen. Bei Laura Carranza Lopez möchte ich mich ebenfalls für die heitere und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die mir manche lange Labortage versüßt hat. Sandra Barchmann danke ich für die zur Verfügung gestellten Sonden und die Hilfe bei der Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen. Alle genannten Mitglieder der Arbeitsgruppe Bolz gaben mir durch ihre kollegiale und hilfsbereite Unterstützung oft viel Kraft und Motivation.

Ein großer Dank geht auch an Frau Raue, deren sorgfältige technische Assistenz mir eine große Hilfe war. Herrn Rapus danke ich ebenfalls für seine Hilfsbereitschaft in diversen kleinen Notsituationen.

Bei unserer Sekretärin Frau Behr möchte ich mich für all ihre freundliche, persönliche und organisatorische Unterstützung, in Hinblick auf das Bestellwesen der Arbeitsgruppe und der Fertigstellung diverser Anträge, bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Franco Weth, für die Beantwortung methodischer und inhaltlicher Fragestellungen und für seine Diskussionsbereitschaft. Außerdem möchte ich an dieser Stelle auch seine Initiative bei der Verwirklichung eines regelmäßigen „Freitagsseminars“ würdigen, wodurch mir Präsentation und Diskussion meiner Ergebnisse in einem größeren Rahmen ermöglicht wurde, was für den Fortgang meiner Arbeit sehr hilfreich war.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern der Nachwuchsgruppe „Neurogenetik“ für die kooperative und angenehme Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Ronny Niehage nennen, der mir seine *in situ* Daten für die Interpretation

meiner Ergebnisse, seine Sonden, seine Protokolle, seine Hilfe und Wissen für die *in situ*-Hybridisierungen zur Verfügung gestellt hat. Außerdem trug er durch seine humorvolle Art immer zur allgemeinen Erheiterung bei, was einfach oft gut getan hat. An dieser Stelle sei auch Liane Dahm gedankt, die mir geduldig und hilfreich bei der Durchführung der *in situ*-Hybridisierungen zur Seite stand. Bei Christoph Gebhardt möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft bei der Klärung von „Statistik-Problemen“ und für die Einarbeitung in das Programm *ImageJ* bedanken. Philip Kaiser danke ich für die Bereitstellung kompetenter Bakterien und für seine Hilfe bei deren Elektroporation. Bei Natja Haag möchte ich mich für ihre freundliche und oft spontane Hilfe bei allerlei kleinen, unvorhergesehenen Dingen des Forschens und Lebens bedanken.

Weiterhin danke ich Robert Lent, der es mir ermöglichte in seinem Labor die „*slice*-Technik“ und einiges mehr zu erlernen. Einen großen Dank auch an Daniela Uziel aus dem Labor von Roberto Lent, für die Übernahme des externen Gutachtens.

Frau Prof. Dr. S. Löwel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Einen Dank auch an meine Freunde, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Urgroßmutter, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte und die immer hinter mir stand. Durch ihre Unterstützung ist mir so einiges ermöglicht und erleichtert wurden. Einen lieben Dank auch an meine Mutti und an den Rest meiner Familie.

8.7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geraldine Zimmer

Geboren am 14.11.1978 in Gera

Schulbildung

1985-1987	Polytechnische Oberschule "Otto-Trilitzsch", Gera
1987-1991	Polytechnische Oberschule "Julius-Fucik", Gera
1991-1993	"Goethe-Gymnasium", Gera
1993-1997	"Georg-Samuel-Doerffel-Gymnasium", Weida
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1997-2002	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Hauptfach Zoologie; Nebenfächer: Neurobiologie, Immunologie
2001-2002	Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena: Thema: „Identifizierung eines neuronalen Verschaltungssignals mit einer massenspektrometrischen Methode (MALDI-TOF-MS)“
Sept. 2002	Diplom, Note „sehr gut“

Promotion

Seit Sept. 2002	Promotion, Thema: „Die Rolle von EphrinA5 bei der Aggregation und Migration kortikaler Neurone während der Entwicklung des Telencephalons“
2002-2005	Mitglied im Graduiertenkolleg 768 „Biomolekulare Schalter“
2005-2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie

8.8. Eigene Publikationen

1. ZIMMER, G. and BOLZ, J.
EphrinA5 induces aggregation and motility of cortical in an SFK-dependent manner,
Publikation in Vorbereitung
2. ZIMMER, G. and BOLZ, J.
The effects of the Eph/ephrin-system on the tangential migration of cortical interneurons,
Publikation in Vorbereitung
3. ZIMMER, G. and BOLZ, J.
EphrinA5 affects cell migration of cortical neurons, Program No. 615.10. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004.
34th annual meeting, San Diego, 2004.
4. ZIMMER, G. And BOLZ, J.
Multiple effects of EphrinA5 on cortical neurons during development
FENS Abstr., vol.2, A148.26, 2004
4th Forum European Neuroscience, Lisbon, 2004
3. ZIMMER, G. And BOLZ, J.
Multiple effects of EphrinA5 on cortical neurons
Cell Signals 2003; Signaling Complexes
1st meeting of the Joint Research Centers
Sonderforschungsbereich 604 and Graduiertenkolleg768